

01475



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

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

“Aislamiento, caracterización y expresión de un  
cDNA obtenido por medio del método de panning a  
partir de una biblioteca derivada de una línea celular  
cementoblástica”

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS (Biología bucal)**

PRESENTA

**Pedro Alberto López Reynoso**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Higinio Arzate



México, D.F. Ciudad Universitaria, Septiembre 2005

m 347767



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.

## ÍNDICE

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: López Pechosa Roberto  
FECHA: 13-SEPT-05  
FIRMA: [Firma]

\* AGRADECIMIENTOS

\* DEDICATORIAS

\* ABSTRACT

\* RESUMEN

\* ABREVIATURAS

<b>1.-INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 El cemento radicular	2
1.2 Clasificación del cemento radicular	3
1.3 Proteínas colágenas del cemento radicular	4
1.4 Proteoglicanos y glucosaminoglicanos en el cemento radicular	5
1.5 BSP y osteopontina en la cementogenesis	5
1.6 PTHrP en la formación del cemento radicular	6
1.7 BMP's en el cemento radicular	6
1.8 Osteocalcina en el cemento radicular	7
1.9 Moléculas de adhesión celular (laminina y fibronectina) en el cemento radicular	7
1.10 MGP, AP y su papel en la mineralización del cemento radicular	8
1.11 Genes tipo "homeobox" (Dlx) en la formación del cemento radicular	8
1.12 Células productoras de cemento radicular (cementoblastos)	9
1.13 CAP y su papel en el cemento radicular	10
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>13</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>13</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>13</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>14</b>
<b>6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>14</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
7.1 Excisión del plásmido "Bluescript" de la biblioteca de cDNA lambda ZAP Express	15
7.2 Recuperación de clones de cDNA por "Panning"	15
7.3 Secuenciación y análisis teórico del cDNA de la proteína recombinante CP34	17
7.4 Construcción del cDNA en plásmidos de expresión bacterianos	17
7.5 Expresión, purificación y concentración de la proteína CP34	19
7.6 Electroforesis de CP34 en geles de poliacrilamida (SDS PAGE)	19
7.7 Electroelución de la proteína CP34	20
7.8 Detección de la proteína recombinante por el método In Vision His-Tag In Gel Stain	20
7.9 Inmunotransferencia	21
7.10 Producción y purificación del anticuerpo policlonal anti-CP34	22
7.11 Análisis de datos	23

<b>8. RESULTADOS</b>	<b>23</b>
<b>8.1 El cDNA CP34 contiene un codon de inicio (ATG) en el nucleótido 96 y el codon de paro (TGA) en el nucleótido 398</b>	<b>23</b>
<b>8.2 El cDNA CP34 codifica una proteína de 11.2kDa con 101 aminoácidos</b>	<b>25</b>
<b>8.3 Construcción del cDNA de CP34 con el vector de expresión en <i>E. coli</i></b>	<b>27</b>
<b>8.4 La proteína CP34 expresada en <i>E. coli</i>, es reconocida en inmunotransferencia por los anticuerpos <math>\alpha</math>-CAP, <math>\alpha</math> -colágena tipo I y III, <math>\alpha</math>-CP34 y <math>\alpha</math>-CP23</b>	<b>29</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>35</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>36</b>

## **\* AGRADECIMIENTOS**

### **Al Dr. Higinio Arzate**

Te agradezco de forma infinita la oportunidad y el apoyo recibido durante todo el transcurso en la elaboración de este trabajo. Y mas importante, la posibilidad que tengo de adquirir elementos muy valiosos en mi formación profesional a través del laboratorio y todo lo que con lleva el estar ahí.

### **Al Dr. Marco Antonio Álvarez**

Muchas gracias Marco por todo el asesoramiento técnico y teórico, el cual fue vital para el avance y culminación de este trabajo.

### **Al Jurado del examen de grado**

#### **Dr. Luís Felipe Jiménez García**

Un especial agradecimiento por las observaciones hechas a este trabajo, así como las enseñanzas transmitidas en la asignatura de biología celular en la cual aprendí muchísimo.

#### **Dr. Jesús Chimal Monroy**

Gracias por las observaciones y aportaciones realizadas a este trabajo. No olvidare el razonamiento continuo y la autocrítica.

#### **Dr. Higinio Arzate**

Gracias por la revisión del escrito y las sugerencias hechas al formato de este trabajo.

#### **Mtro. Juan A. Molina Guarneros**

Por la revisión y observaciones hechas a este trabajo.

#### **Dra. Laurie Ann Ximenez Fyvie**

Gracias por la minuciosa revisión de este escrito, así como por las aportaciones hechas al formato de esta tesis.

#### **A los compañeros del laboratorio (Marco, Rene gracias por el artículo de BMP, Bruno, Du)**

Les agradezco muchísimo el apoyo en los experimentos, la asesoría y el debate teórico. Con ustedes he enriquecido mi manera de pensar.

**Al Dr. Jorge Membrillo**

Por inculcar en mí una mejor y más eficiente manera de razonar de lo que leo y aprendo.  
“Algo que nunca hubiese aprendido en la clínica”.

**Al Dr. Edgar Zenteno**

Un agradecimiento especial por la confianza depositada en mí. No olvidare el apoyo recibido.

**A la Dra Aida y Al Dr. Mario**

Gracias por los elementos transmitidos de manera tan clara: la estadística y la metodología.

## **\*DEDICATORIAS**

### **A DIOS**

Señor gracias por que siempre estas ahí.

### **A JESUCRISTO**

Gracias amigo, por demostrarme que todo el tiempo me acompañas.

### **A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO "LA MAXIMA CASA DE ESTUDIOS" (C.C.H Sur)**

Estoy sumamente agradecido por todo lo recibido, espero retribuir pronto de acuerdo a tu grandeza. Vuelvo a insistir, no hay mayor orgullo que ser "puma universitario".

### **A LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA Y A LA DIVISION DE POSGRADO**

Gracias por la oportunidad de tener tan grande privilegio: ser alumno de posgrado.

### **A MIS PADRES**

Les agradezco con mayor emoción este paso. El logro es nuestro, porque en verdad así se realizo: "entre todos". Los amo.

### **A MIS HERMANAS (Vanesa, Susana, Vickita y familia)**

Gracias, por que nos unen cosas fabulosas. Y esto nos hacer seguir adelante, pronto estaremos disfrutando juntos otra vez. Nuevamente campeones arriba el "America".

### **A GISELA**

Eternamente gracias, por seguir acompañándome en este viaje pero? aun nos faltan cosas por hacer, el camino es largo. Felicidades por tu especialidad you did it. ¡No que no! TE AMO.

### **A MIS TIOS (Abuelita Graciela, Georgina, Héctor, Lalo, Jesús, primos Nicolás, Mariana).**

La esencia que tengo y que perdura en lo que hago viene de ahí. Gracias por todo, los Amo.

### **A MIS TIOS Y PRIMOS LOPEZ HERRERA**

Gracias por la confianza depositada en mis hombros. Espero haber cumplido. Los estima Pedro.

### **RAUL, TERE y familia**

Agradezco cada plática, eso enriquece el espíritu. Muchas gracias.

**A MIS AMIGOS (PARK-Q, Boss, Deivid, Tom, Richard, Alex, Bobo y la clínica san Andrés, Batuquin, Aron, Oso, Nitzia, Charly, Araceli, Marco, Reno, Arge, Yunuen, Bruno, Chiquidu, Rube, Luis, Perlilla, Carlilla, la Chivis, la golzarri, Nelda, Kenia, Cintia, Karina, Jesús Micotico y a los del grupo 1006 sin excepción)**

Gracias por el tiempo que han compartido en este tiempo de Posgrado, fue algo vital en el pasar de los días y mis actividades.

### **AI FUTBOL**

La pasión se incrementa día a día y esto me inspira en las cosas que hago, porque el fut es formativo. Es mi ultimo tren y así lo tomo, demostrare lo aprendido; permite que goce estos momentos y que lo sepa complementar con la escuela como hasta ahora. Una mención a mi entrenador, mi tío entrenador deportivo Lic. Gabriel López por recuperar mi forma deportiva.



## ABSTRACT

Nowadays, the main goal of the periodontal therapy is the regeneration of periodontal structures such as cementum, bone, periodontal ligament and gingival lost due periodontal disease. The knowledge of the cellular and molecular events during cementum development, are important for periodontal biology and tissue regeneration, however, this process is poorly known and there is a lack of a specific biological marker for cementum. Here we report the isolation and partial characterization of a cDNA named CP34, derived from a human cementoblastoma. The cDNA was analyzed in databases (BLAST), in order to find homology with other reported proteins, and to predict the possible secondary structure. The cDNA construction was cloned into a prokaryotic expression vector to achieve expression and purification of the recombinant protein. Results from the database analysis showed that CP34 has 98% identity with the cementum attachment protein (CAP), and also has 98% identity with a tyrosine phosphatase receptor PTPLA. The aminoacid sequence analysis predicted a secondary structure mainly  $\alpha$ -helix.. Expressed and purified CP34 protein was detected by the anti-CAP and anti-collagen type I and III antibodies in western blots. These data show relationship of CP34 with CAP, because the cementum attachment protein has certain homology with collagen I and has a  $\alpha$ -helix structure. Therefore, CP34 could participate during cementogenesis events such as mineralization, attachment and cellular differentiation as it has been demonstrated for CAP. It is important to notice that the database analysis did not predict a signal peptide for CP34, therefore this protein could not be in the extracellular matrix. This finding is relevant because of the 98% homology with the PTPLA receptor, and the aminoacid sequence is mainly acidic which is in agreement with these type of receptors. This is why the relation of CP34 with cementum, could be in signaling events on the cells responsible for the formation of mineralized tissues.

The results of this work contributes with knew knowledge regarding the cementum biology and cementogenesis processess.

## RESUMEN

En la actualidad una de las metas de la terapia periodontal es la regeneración de los tejidos de soporte del diente (hueso, cemento radicular, ligamento periodontal y encía) que han sido destruidos por la enfermedad periodontal. De tal forma, que la determinación de los procesos celulares y moleculares que regulan la formación del cemento radicular durante el desarrollo, es de gran interés en el área de la biología y la regeneración periodontal, debido a que a la fecha dichos procesos se conocen parcialmente y no existe un marcador biológico del cemento radicular. Este trabajo reporta el aislamiento y caracterización de un DNA complementario (cDNA) denominado CP34 derivado de células de un cementoblastoma humano. La secuencia del cDNA fue analizada en la base de datos en Internet, con la finalidad de encontrar homologías con otras proteínas de importancia en el cemento radicular y pronosticar una posible estructura secundaria. Posteriormente se realizó la construcción del cDNA CP34 con un vector de expresión, en un sistema procarionte para producir y purificar la proteína recombinante. Los resultados en la base de datos demostraron que CP34 tiene una identidad del 98% con la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) y un 98% también para el receptor tipo tirosina fosfatasa PTPLA, además de que la secuencia aminoacídica pronostica predominantemente una estructura  $\alpha$ -hélice; la proteína CP34 expresada y purificada fue reconocida en las inmunotransferencias por los anticuerpos anti-CAP y anti-colágena tipo I y III. Estos datos podrían relacionar a CP34 con la CAP, ya que la proteína de adhesión del cemento radicular es conocida por tener homología con colágena tipo I y tener una estructura tipo  $\alpha$ -hélice. Por lo que CP34, podría participar a reserva de ensayos biológicos, en eventos importantes para la cementogénesis como la mineralización, adhesión y diferenciación celular como lo ha demostrado la CAP. Sin embargo, es importante mencionar que la base de datos no

predijo péptido señal para la secuencia de CP34, por lo que esta proteína no podría estar en la matriz extracelular. Este hallazgo tiene evidentemente relación con la homología del 98% con el receptor PTPLA que tiene CP34, además de que la secuencia aminoacídica de CP34 es hidrofílica como en este tipo de receptores. Por lo que su relación con el cemento radicular, podría quedar involucrada en los eventos de señalización intracelular de este tipo de receptores en células formadoras de tejido mineral como ya se ha demostrado en osteoblastos.

Los resultados del presente estudio demuestran que el modelo utilizado de células derivadas de cementoblastoma contribuye con el aislamiento de factores asociados al cemento radicular y a un mejor entendimiento del proceso conocido como cementogénesis.

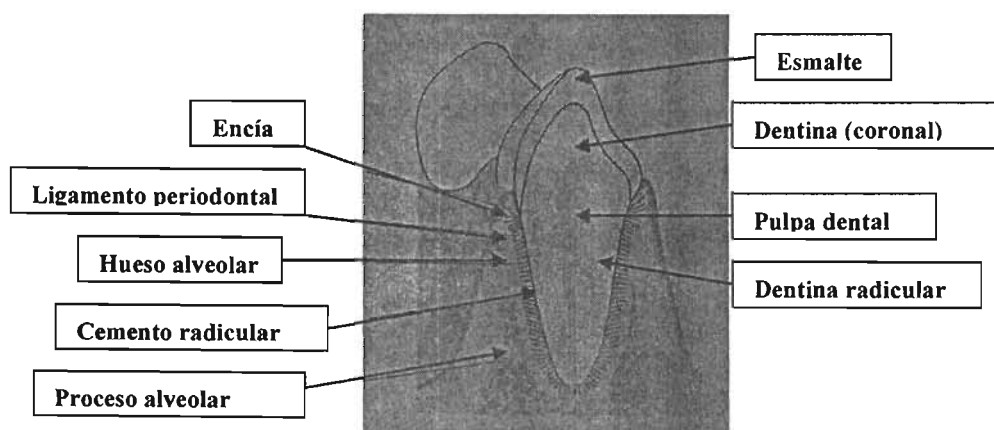
## ABREVIATURAS

PDL	Ligamento periodontal
AAC	Cemento afibrilar y acelular
AEFC	Cemento acelular con fibras extrínsecas
CIFC	Cemento celular con fibras intrínsecas
AIFC	Cemento acelular con fibras intrínsecas
CSHC	Cemento celular estratificado mixto
MGP	Proteína de la matriz $\gamma$ -ácido carboxiglutámico
BSP	Sialoproteína ósea
BMP's	Proteínas morfogénicas del hueso
PTHrP	Proteína relacionada a la hormona paratiroidea
cAMP	Pirofosfato monociclito de Adenosina
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
RGD	Arginina, glicina, ácido aspartico
CGF	Factor de crecimiento del cemento radicular
IGF-I	Factor de crecimiento tipo insulínico I
CAP	Proteína de adhesión del cemento radicular
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
AP	Fosfatasa alcalina
MAP	Proteína cinasa activada por mitogeno
cDNA	DNA complementario
RNAm	RNA mensajero

O.D	Densidad óptica
r.p.m	Revoluciones por minuto
PTPLA	Proteína tipo tirosina fosfatasa
AP	Fosfatasa alcalina
PBS	Solución salina de fosfatos salinos
BSA	Albúmina de suero bovino
FBS	Suero fetal bovino
IPTG	Isopropil-D-betagalactosidasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
DAB	Diamino benzidina
NTA	Ácido nitrilotriácetico

# 1. INTRODUCCIÓN

Los órganos dentales anatómicamente están constituidos por la corona, que es la parte que se proyecta hacia la cavidad bucal y la raíz que se incluye dentro del hueso alveolar. Ambas partes, están conformadas por tejidos mineralizados que cubren en su interior a la pulpa dental la cual le proporciona al diente nutrición e inervación; ya que esta constituida por vasos sanguíneos, vasos linfáticos y terminaciones nerviosas que se introducen por el foramen apical de la raíz dental. Histológicamente la corona dental esta conformada por dos tejidos mineralizados, el esmalte en la capa externa y la dentina en la capa interna; la raíz dental esta cubierta por dos tejidos mineralizados, en la parte externa se encuentra el cemento radicular y en la interna la dentina radicular. Por otra parte, el aparato de sostén del diente en la cavidad bucal conocido como periodonto esta constituido por cuatro tejidos: dos tejido blandos que son la encía la cual cubre los procesos alveolares y esta constituida por tejido epitelial estratificado con un subyacente tejido conectivo y por el ligamento periodontal que esta integrado por fibras colágenas (principalmente de colágena tipo I) que se insertan tanto en el cemento radicular como en el hueso alveolar que son los tejidos duros del periodonto<sup>1</sup>(Figura 1).



**Figura 1.** Esta figura muestra los tejidos del diente, así como el sistema de soporte dental conocido como periodonto (encía, cemento radicular, hueso alveolar y ligamento periodontal).

## 1.1 El cemento radicular

El cemento radicular es un tejido conectivo mineralizado que cubre la superficie radicular de los órganos dentarios desde la unión cemento-esmalte que regularmente se encuentra en el cuello del diente en la unión de la corona y la raíz dental hasta el ápice que es la parte más distal de la raíz dental. El cemento radicular es un componente importante del aparato de inserción del periodonto debido a que es el sitio donde las fibras del ligamento periodontal se unen al diente. Este tejido posee características únicas como: la ausencia de vascularización, inervación y drenaje linfático; además de poseer un bajo recambio metabólico. El cemento radicular es de suma importancia para la formación de tejidos periodontales durante el desarrollo, así como para la regeneración de los mismos. Físico-químicamente está constituido por un 50% de matriz inorgánica a base de fosfatos de calcio en forma de hidroxiapatita y una matriz orgánica compuesta predominantemente por colágena tipo I y III <sup>2,3</sup>.

La enfermedad periodontal conocida como periodontitis, está caracterizada por la inflamación y la subsecuente pérdida de los tejidos de soporte del diente; incluyendo el cemento radicular, el hueso y el PDL. En el caso específico del cemento radicular, cuando es contaminado por endotoxinas bacterianas y/o ha sufrido alteraciones en su formación debido a desórdenes metabólicos, el resultado es la pérdida de inserción del PDL en la raíz del diente, por lo que se sugiere que existe una correlación entre el cemento radicular alterado y la enfermedad periodontal <sup>4</sup>. Una de las metas de la terapia clínica periodontal, es tratar de propiciar la regeneración de los tejidos de soporte del diente perdidos por enfermedad. Sin embargo cuando el hueso logra ser regenerado alrededor de las raíces dentales, sólo tiene valor funcional cuando va acompañado de la formación de cemento radicular nuevo y la inserción del ligamento periodontal sobre este tejido. Clínicamente la regeneración del cemento es crucial para restaurar la

inserción de los tejidos de soporte, ya que las superficies radiculares dañadas no pueden promover la adhesión y la migración de células del ligamento periodontal <sup>5,6,4</sup>.

## **1.2 Clasificación del cemento radicular**

Este tejido se clasifica de forma general en cemento primario, el cual se describe como una estructura desprovista de células con fibras colágenas orientadas al azar en una matriz granular y el cemento secundario que contiene células y fibras colágenas orientadas ligeramente paralelas tanto a la superficie radicular como a las fibras de Sharpey. Estas últimas son porciones de las fibras principales de colágena del PDL, las cuales están embebidas en el cemento radicular y en el hueso alveolar; una porción mayor del cemento acelular consiste en agregados de fibras de Sharpey's las cuales han sido mineralizadas<sup>1</sup>. En el cemento acelular tienen un diámetro menor y están más densamente empaquetadas que en el hueso alveolar, estas fibras forman parte del sistema de fibras extrínsecas del cemento y son producidas por fibroblastos en el PDL. Actualmente existe una nueva clasificación para el cemento radicular basada en la presencia o ausencia de células en el tejido y en la organización de fibras colágenas, que reconoce 5 subtipos que son <sup>7</sup>:

1. Cemento afibrilar y acelular (AAC). Está localizado en la unión dentina esmalte, esta estructura consiste de una matriz homogénea sin componentes celulares y sin fibras de colágenas.
2. Cemento acelular con fibras extrínsecas (AEFC). Se encuentra desde la región cervical hasta la parte media de la raíz, no contiene células, pero sí fibras de Sharpey involucradas en la inserción del órgano dentario.
3. Cemento celular con fibras intrínsecas (CIFC). Cubre la parte apical e interradicular de las superficies radiculares donde los cementocitos están



presentes a lo largo de estas zonas junto con las fibras colágenas intrínsecas. Está localizado en lagunas de resorción y sitios de fractura, por lo que podría estar involucrado en la reparación del cemento radicular.

4. Cemento acelular con fibras intrínsecas (AIFC). Es similar al subtipo 3 ya que ocupa zonas apicales e interradiculares, solo que no contiene células.
5. Cemento celular estratificado mixto (CSHC). Este subtipo de cemento contiene fibras colágenas extrínsecas e intrínsecas así como cementocitos; está involucrado en la inserción y la adaptación de las fibras periodontales.

### **1.3 Proteínas colágenas del cemento radicular**

Dentro de la fase orgánica del cemento radicular se encuentran una amplia variedad de proteínas colágenas, que desempeñan diferentes funciones durante diversas etapas en la formación de este tejido, por ejemplo en el desarrollo, el cemento maduro y en la regeneración del cemento radicular. Se ha demostrado que la colágena tipo I y tipo III participan en la regulación del crecimiento de cristales de hidroxiapatita, durante el desarrollo del cemento radicular <sup>8, 9</sup>. El cemento radicular maduro tiene un alto porcentaje de colágena tipo I y en menor porcentaje colágena tipo III y XII. Las cuales participan según estudios realizados *in vitro* en la adhesión y quimioatracción de fibroblastos del PDL<sup>8</sup>. Las colágenas tipo III y XII han sido asociadas a la reparación de heridas y al soporte de tensión en tejidos periodontales asociados con movimientos ortodóncicos <sup>10</sup>.

Estudios en los cuales se ha utilizado la técnica de inmunohistoquímica, han demostrado que las fibras colágenas del cemento, incluyendo las fibras de Sharpey's están constituidas por colágena tipo I. Las fibras no reconocidas por el anticuerpo anti-colágena I, incluyendo algunas fibras colágenas recién sintetizadas son reconocidas por

el anticuerpo de anti-colágena tipo III <sup>11</sup>. La colágena tipo V y VI no son reconocidas en el cemento, pero sí la del tipo XIV <sup>12</sup>.

#### **1.4 Proteoglicanos y glucosaminoglicanos en el cemento radicular**

Proteoglicanos como el lumicano y fibroglicano han sido identificados en el cemento radicular de bovino en zonas cercanas al precemento y alrededor de lagunas donde se encuentran inmersos los cementocitos <sup>13</sup>.

La fibromodulina es un proteoglicano encontrado de forma abundante en el ligamento periodontal durante el desarrollo del cemento; específicamente sobre la interfase del cemento y el ligamento periodontal. Por lo que se considera que puede tener un papel importante en la formación y mantenimiento de las fibras de Sharpey, además de regular la mineralización durante la cementogénesis <sup>14</sup>. Glucosaminoglucanos, como el dermatan sulfato y coindritin sulfato <sup>4</sup> han sido identificados bioquímicamente e inmunohistoquímicamente como las especies predominantes en este tejido. Estos compuestos han sido co-localizados con cementoblastos y la matriz del cemento durante la mineralización <sup>15</sup>.

#### **1.5 BSP y osteopontina en la cementogenesis**

La BSP y la osteopontina generalmente se co-distribuyen y se acumulan en las líneas de crecimiento del cemento radicular y entre los espacios de las fibras colágenas mineralizadas. Sin embargo, hay variaciones en la distribución y densidad del marcaje tanto de BSP como de osteopontina durante la cementogénesis. Una amplia expresión de estas proteínas no colagénicas generalmente se correlaciona con la formación del hueso esponjoso y el AEFC; además de participar en la velocidad de formación del tejido mineralizado y la densidad de empaquetamiento de fibras colágenas <sup>16</sup>. La

expresión temporal y espacial de la BSP durante la cementogénesis, está relacionada con la formación de tejido mineralizado <sup>17, 18</sup>. La BSP se asocia a la adhesión celular y contribuye al inicio de la formación de tejido mineralizado sobre la superficie radicular <sup>19</sup>. La fosfoglucoproteína llamada osteopontina que contiene una región RGD (arginina, glicina y ácido aspártico), reconocida como dominio asociado a la adhesión; ha demostrado promover la migración, la adhesión de células progenitoras del PDL y la nucleación de cristales de hidroxiapatita durante la formación del cemento radicular. Incluso se le ha relacionado con la regulación ectópica de cristales de hidroxiapatita <sup>20, 21</sup>.

### **1.6 PTHrP en la formación del cemento radicular**

La PTHrP actúa como regulador autócrino y parácrino en diversos procesos biológicos como: proliferación, apoptosis y diferenciación celular durante el desarrollo del diente. Se ha demostrado que la PTHrP participa en la regulación de la formación del cemento radicular ya que esta involucrada en la disminución de la expresión génica y la síntesis de BSP; además de inhibir la mineralización mediada por cementoblastos. Además de que la vía de señalización intracelular cAMP/PKA, es la que media el efecto de PTHrP para inhibir la expresión del RNAm de BSP y que la PKC promueve la expresión de BSP <sup>22</sup>.

### **1.7 BMP's en el cemento radicular**

Las BMP's son factores de crecimiento pertenecientes a la superfamilia de los TGF $\beta$ , que juegan un papel crítico en desarrollo del cartílago, hueso, tejidos no mineralizados como el corazón y el sistema nervioso; postnatalmente participa en la formación del hueso <sup>23</sup>. Se ha demostrado que las BMP's participan en la formación de tejidos dentales

como el esmalte y la dentina. De este grupo de proteínas, la BMP-3 u osteogenina, se ha relacionado con la formación del cemento, ya que se han detectado transcritos de la misma que son expresados por células del folículo dental que rodean las raíces en molares de ratón <sup>24</sup>. En el caso de la BMP-2 esta parece participar en la regeneración del cemento, ya que tiene la propiedad de promover la proliferación y migración de células del ligamento periodontal; además de inducir la formación del cemento radicular en dientes de ratón con defectos en la superficie radicular <sup>25</sup>.

### **1.8 Osteocalcina en el cemento radicular**

La osteocalcina, también llamada proteína Gla del hueso (BGP), es la más abundante de las proteínas no colágenas del hueso producidas por osteoblastos. Esta consiste en una sencilla cadena de 46-50 aminoácidos y que contiene tres residuos ácido gamma carboxiglutamico vitamina k dependiente y es conocida por participar en el remodelado óseo <sup>26</sup>. La osteocalcina también participa en la formación del cemento radicular tanto del tipo celular como el acelular <sup>27</sup>. En parte esto se demostró en un estudio de Kagayama *et al*<sup>28</sup> donde utilizando inmunohistoquímica, se observó que los cementoblastos formadores del cemento acelular eran positivos para osteocalcina durante la cementogénesis en dientes de rata de dos y tres semanas de edad.

### **1.9 Moléculas de adhesión celular (laminina y fibronectina) en el cemento radicular**

La laminina conocida por ser una molécula de adhesión celular, es localizada sobre la superficie de la dentina en el inicio de la formación del cemento radicular; por lo que su función está relacionada con la quimioatracción de células tipo cementoblásticas, sobre las superficies radiculares durante la cementogénesis <sup>29</sup>. También las proteínas de la

matriz extracelular como la fibronectina y su receptor la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , están asociadas a la adhesión celular durante el proceso de cementogenesis; ya que han sido inmunolocalizadas en cementoblastos y en células del PDL cercanas a la raíz dental, durante el período de formación del cemento radicular en molares de rata <sup>30</sup>.

### **1.10 MGP, AP y su papel en la mineralización del cemento radicular**

La MGP con su dominio tipo Gla, participa como regulador negativo de la aposición de mineral en el cemento. Se ha demostrado que esta proteína se encuentra en el cemento acelular y en la superficie exterior del cemento celular mineralizado. Hibridaciones *in situ* realizadas para el RNAm de la MGP demuestran que este es producido por células del ligamento periodontal sobre la superficie del cemento radicular celular y acelular; por lo que la expresión de MGP en este sitio podría prevenir la hipercalcificación de la superficie externa de la raíz <sup>31</sup>. Por su parte la fosfatasa alcalina conocida por participar en el proceso de mineralización, también está involucrada en la formación del cemento celular y acelular. Esta enzima tiene una elevada actividad durante la niñez, lo cual se relaciona con el incremento en la formación y grosor de la capa de cemento acelular durante este período; la actividad de la fosfatasa alcalina y su efecto sobre el cemento radicular disminuyen conforme avanza la edad <sup>32,33</sup>.

### **1.11 Genes tipo “homeobox” (Dlx) en la formación del cemento radicular**

Los genes tipo “homeobox” como el Msx y el Dlx codifican factores de transcripción que juegan un papel importante durante la morfogénesis del diente <sup>34</sup>. Estudios con ratones han permitido la identificación de sus patrones de expresión, los cuales están involucrados en distintas regiones craneofaciales durante su desarrollo <sup>35</sup>. También los genes Dlx en etapas finales de la formación de tejidos dentales, se han identificado de

acuerdo con mutaciones asociadas; como la del gen *Dlx3* que provoca el síndrome tricodonto-óseo caracterizado por defectos en la raíz dental y en el esmalte de molares en maxilares <sup>36</sup>. En un estudio de Lezot *et al.* <sup>37</sup> realizado en ratones transgénicos con el factor de transcripción de la homeoproteína del gen *Dlx-2*, se observó que su expresión se encontraba en la mayoría de los cementoblastos diferenciados durante la formación del cemento acelular, tanto en dientes incisivos como en molares. Durante la formación del cemento celular específicamente en molares, la expresión del *Dlx-2* fue restringida a cementoblastos y cementocitos que quedaban atrapados en la matriz.

### **1.12 Células productoras de cemento radicular (cementoblastos)**

Actualmente las células encargadas de producir la matriz del cemento no han sido completamente caracterizadas. Sin embargo, se ha sugerido que estas células podrían derivar de las células progenitoras con localización paravasculares en el PDL o de células provenientes de los espacios endosteales del hueso alveolar <sup>38</sup>. Por otra parte se han aislado y cultivado células derivadas del cementoblastoma humano, que producen proteínas relacionadas con el cemento radicular. Estas células se caracterizan por una morfología tipo fibroblástica en un inicio, sin embargo entre la sexta y octava semana de cultivo la morfología se torna en forma de red. Dichas células también manifiestan un perfil tipo osteoblástico, con la producción de fosfatasa alcalina y sialoproteína ósea. A los 30 días de cultivo son capaces de formar tejido mineralizado en presencia de  $\beta$ -glicerofosfato, dexametasona y ácido ascórbico <sup>39</sup>. Por otra parte, en un estudio de D'errico *et al.* <sup>40</sup> se propone una línea celular proveniente de raíces de ratón que podría representar el fenotipo cementoblástico, ya que estas células pueden expresar diferentes marcadores asociados con el hueso como colágena tipo I, BSP, osteocalcina y osteopontina.

### 1.13 CAP y su papel en el cemento radicular

Se ha purificado y parcialmente caracterizado una proteína del cemento radicular que al parecer es cemento-específica, denominada CAP. Por medio de un anticuerpo monoclonal generado contra esta proteína, se determinó que ésta se localiza en la matriz de cemento humano, en algunas células paravasculares del ligamento periodontal y en los espacios endosteales del hueso alveolar. La CAP fue caracterizada en un estudio de Wu *et al.*<sup>41</sup> donde se describe una proteína tipo colágena de 56kDa; en la que seis secuencias de péptidos obtenidos, no se encontraron en otras proteínas de adhesión descritas en cemento. Parte de su secuencia contienen repeticiones con los tripletes típicos de colágena Gly-X-Y; tiene homología del 82% con un dominio de colágena tipo XII y un 95% con la colágena tipo I alfa bovina. Sin embargo los anticuerpos para colágena tipo I, V, VII y XIV no reconocen a esta proteína del cemento. De igual forma anticuerpos policlonales para osteopontina y vitronectina, no presentan reacción cruzada con la CAP. Se ha demostrado que esta proteína promueve la adhesión de células derivadas del periodonto; además de tener una alta afinidad por fibronectina, hidroxiapatita, dentina y cemento radicular. Este efecto de adhesión probablemente puede ser propiciado por un motivo RGD que se encuentra en su secuencia<sup>42, 43, 44, 45</sup>.

Recientemente la CAP fue purificada por cromatografía de inmunoafinidad con un anticuerpo policlonal anti-CAP acoplado a una columna de sefarosa. El anticuerpo fue producido a partir de la CAP obtenida del medio condicionado de cementoblastos, aislados de explantes de un cementoblastoma humano. En este estudio se demostró que dicha proteína del cemento radicular, promueve notablemente la adhesión de fibroblastos gingivales humanos *in vitro*, en comparación con la colágena tipo I<sup>39</sup>.

Por otra parte, se ha determinado *in vitro* que poblaciones celulares del ligamento periodontal adheridas a raíces preparadas con CAP y que expresan esta proteína; tienen

como efecto la capacidad de producir fosfatasa alcalina y formar tejido mineralizado. También se han utilizado células progenitoras del ligamento periodontal de donadores humanos que se unen con CAP, la expresan y son capaces de formar tejido mineralizado <sup>46,47</sup>.

La CAP tiene un efecto respecto a la migración y la adhesión de células derivadas del periodonto. Este efecto se da principalmente en células de hueso alveolar, en menor proporción en las células del ligamento periodontal y prácticamente sin efecto en fibroblastos gingivales humanos. También incrementa la expresión AP, BSP y osteopontina. Además de promover la formación de nódulos de mineralización y el reclutamiento de células del ligamento periodontal que pueden diferenciarse en cementoblastos sobre la superficie radicular <sup>48,49</sup>.

En un estudio de Saito *et al* <sup>50</sup> fue generado un anticuerpo monoclonal anti-CAP denominado 3G9, con el que se logró aislar la CAP de gérmenes dentarios de bovino. Esta proteína fue inmunolocalizada sobre la matriz de cemento radicular y en los cementoblastos. Los ensayos de adhesión *in vitro* realizados en este estudio, demostraron que esta proteína promueve la adhesión de células del folículo dental. Por lo que a partir de estos datos se sugirió que la CAP pudiese participar también durante la cementogénesis.

En cuanto a los eventos de señalización intracelular inducidos por la CAP durante la adhesión celular, se conoce hasta ahora que la actividad de la MAP cinasa es estimulada; induciendo así la expresión del RNAm de *fos* en fibroblastos gingivales humanos. Aunque hasta el momento se desconoce el receptor de la CAP que desencadena dichos eventos celulares <sup>51</sup>.

Por otra parte, se ha logrado también aislar un factor mitogénico del cemento radicular que tiene efecto sobre fibroblastos gingivales *in vitro*, que inicialmente fue llamado



CGF, ahora considerado como factor tipo IGF-I/CGF, debido a que dos péptidos de su secuencia tienen homología con el IGF-I <sup>52,53</sup>.

Recientemente en el laboratorio de biología celular y molecular de la división de estudios de posgrado en odontología de la UNAM se han aislado diversas clonas de cDNA derivadas de un tumor cementoblástico por medio del método de "panning", de las cuales la clona denominada CP-34 podría representar la especie CAP.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La regeneración de los tejidos periodontales dañados por enfermedad periodontal, es en la actualidad una de las metas en la terapia periodontal. Por lo que el dilucidar los mecanismos celulares y moleculares durante el desarrollo del cemento radicular, el cual forma parte del periodonto adquiere una gran importancia. Además de encontrar y caracterizar nuevos factores o proteínas cemento-específicas que pudiesen estar relacionadas con la formación del cemento radicular como la CAP, que hasta el momento es el único marcador biológico de este tejido y del cual se desconoce el gen que la codifica. Por lo que ¿El aislamiento y caracterización de proteínas como CP34, que deriva del modelo de células de cementoblastoma, podría estar involucrada en el proceso de cementogénesis?

## **3. JUSTIFICACIÓN**

La expresión y caracterización de factores o proteínas derivadas de cementoblastoma como la CP34, podrían proporcionar nuevos elementos que permitan entender los eventos celulares y moleculares del proceso de la cementogénesis.

## **4. HIPÓTESIS**

El producto de la expresión de una clona de cDNA denominada CP34 obtenida a partir de una biblioteca de cDNA de una línea celular cementoblástica, codifica para la proteína de adhesión del cemento radicular.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Expresar y caracterizar el cDNA de la clona CP34.

## **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Expresar en un sistema procarionte la proteína CP34 a partir de la construcción del cDNA con un vector de expresión inducible en *E. coli*.
2. Analizar la secuencia de CP34 para determinar su relación con el cemento radicular
3. Producir un anticuerpo policlonal anti-CP34.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Excisión del plásmido “Bluescript” de la biblioteca de cDNA lambda ZAP Express

La biblioteca de cDNA  $\lambda$  ZAP Express *EcoRI*/*XhoI* (Stratagene, La Jolla CA) fue construida utilizando RNAm, obtenido de células derivadas de un cementoblastoma humano. Se recobraron los insertos de cDNA como plásmidos “Bluescript” (Invitrogen) por excisión de la biblioteca  $\lambda$  ZAP usando un fago cooperador denominado ExAssit (Invitrogen). Posteriormente 250  $\mu$ L de stock del fago fueron incubados con 200  $\mu$ L de células *E. coli* (XL1-Blue MRFa) hasta obtener una O.D<sub>600</sub>=1.0. Posteriormente se agregó 1  $\mu$ L del fago cooperador ExAssit ( $>1 \times 10^6$  pfu) y 3 mL de medio NZY(Gibco), dejando en crecimiento por 3hrs. La mezcla fue calentada a 65°C por 20 minutos y centrifugada a 1000 r.p.m por 15min, 100  $\mu$ L de sobrenadante fueron incubados con 200  $\mu$ L de células *E.coli* XL0LR a 37°C hasta obtener una O.D<sub>600</sub>=1.0. 50  $\mu$ L de esta mezcla fueron plaqueados sobre placas de kanamicina (Invitrogen) (50  $\mu$ g/mL) e incubadas toda la noche a 37°C, las colonias bacterianas que contenían el plásmido “Bluescript” con el inserto de cDNA se colocaron en medio LB (Gibco) para su crecimiento toda la noche. El DNA súper enrollado fue preparado con el kit miniprep Quiaprep, para la recuperación de plásmidos con el inserto de cDNA (Quiagen, Valencia CA).

### 7.2 Recuperación de clonas de cDNA por “Panning”

Las placas para realizar el “panning” (método de inmunoadsorción de clonas celulares) fueron preparadas de acuerdo a lo descrito por Wysocky y Sato<sup>54</sup>. Las cajas de cultivo bacteriológico de 6cm fueron cubiertas por 2hrs con un anticuerpo de cabra anti-conejo IgG (SIGMA) a una concentración de 5  $\mu$ g/mL diluido en solución de

fosfatos salinos (PBS); posteriormente las cajas bacteriológicas se lavaron con PBS y los sitios no reactivos fueron bloqueados durante toda la noche en PBS con BSA (SIGMA) a una concentración de 2mg/mL. Las placas fueron preparadas en cantidades suficientes y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En el “panning” las placas de 100mm tratadas para cultivo celular con un 50 a 80% de células fibroblásticas COS-7, fueron transfectadas con 16  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico súper enrollado obtenido de la biblioteca substraída. Para el protocolo de transfección utilizando el reactivo de Lipofectamina Plus, fue realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Entre las 48 y 72hrs después de la trasfección, las células fueron despegadas con PBS, 1mM EDTA y 5% FBS e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Las células despegadas fueron centrifugadas y posteriormente resuspendidas en una solución de PBS con 10mM EDTA y 5% FBS que contenía un anticuerpo policlonal anti-CP en una dilución 1:1000 en hielo por durante 1 hora. Las células después fueron diluidas 1:1 con la solución de PBS, 1mM EDTA y 0.5%  $\text{NaN}_3$  y 10mL de PBS, 1mM EDTA y 0.5%  $\text{NaN}_3$  con 2% de Ficoll 400. Después las células se centrifugaron a 1500 r.p.m por 5 minutos, el sobrenadante fue aspirado cuidadosamente y el botón resuspendido en una pequeña cantidad de PBS, 1mM EDTA/5% FBS. Las células fueron incubadas por 2 hrs a temperatura ambiente en las placas que ya habían sido cubiertas con anticuerpo IgG, lavando posteriormente tres veces gentilmente con PBS, 1mM EDTA 5% FBS; las células que se adhirieron a las placas fueron retiradas con un raspador de células. El plásmido de DNA fue aislado con el Kit Quiaprep de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Quiagen, Valencia CA). El DNA de la primera parte del “panning” se utilizó para transformar a células competentes de *E. coli*, las colonias resultantes fueron agrupadas y multiplicadas por crecimiento en medio LB con kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Invitrogen). El proceso de “panning” fue repetido en el mismo orden tres veces o más para obtener fibroblastos

COS-7 con el anticuerpo anti-CP. Los plásmidos provenientes de colonias individuales positivas fueron analizados por el tamaño del inserto a través de PCR utilizando los arrancadores T3 y T7 (templado de DNA 100ng en 1  $\mu$ L , amortiguador 10X 5  $\mu$ L, dNTP's 0.5  $\mu$ L, arrancadores de T3y T7 0.1  $\mu$ g/  $\mu$ L cada uno en 1  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 41.5  $\mu$ L y Taq polimerasa 1-2 U/  $\mu$ L en 1 $\mu$ L). Con programa de 25 ciclos donde la desnaturalización inicial fue por 2 minutos a 94°C , la desnaturalización 1 min a 94°C, alineamiento 1 min a 55°C , la extensión 1 min a 72°C y una extensión final de 7 min 72°C . Finalmente digerido con las enzimas de restricción EcoR I y Hind III (Stratagene).

### **7.3 Secuenciación y análisis teórico del cDNA de la proteína recombinante CP34**

Los plásmidos con el cDNA de CP34 fueron sujetos a secuenciación direccional usando un secuenciador de DNA ABI Prism 377 ( Dye-termination chemistry). Los cambios de nucleótidos fueron detectados por identificación de dobles picos en el cromatograma para la muestra de DNA heterocigota y confirmada por secuenciación de la dirección opuesta. La secuencia de CP34 se introdujo a la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para determinar homología con proteínas conocidas, caracterizar la estructura de acuerdo a su composición de aminoácidos y determinar posibles modificaciones postraduccionales.

### **7.4 Construcción del cDNA en plásmidos de expresión bacterianos**

Las clonas recombinantes fueron construidas con el vector pENTR/SD para la clonación direccional del producto de PCR CP34 de extremo romo (Invitrogen, Carlsbad, CA). El arrancador sentido para el producto de PCR CP34 fue diseñado agregando 4 pares de bases (CACC) en el extremo 5' del arrancador sentido, seguido por un codón de inicio

(ATG) para un adecuado inicio de la traducción y una correcta dirección de clonación. El arrancador antisentido fue diseñado eliminando el codón de paro nativo en orden para fusionar el producto con la cola de histidinas en la terminal carboxilo, recombinando la clona de entrada con el vector de destino Gateway pET-DEST 42 (Invitrogen, Carlsbad, CA) inducible para su expresión. El vector pDEST 42 contiene un epítipo V5 y una marca de 6x His que es fusionada en la terminal-COOH de la proteína recombinante durante la traducción, la cual es utilizada para la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad en una columna de Ni<sup>2+</sup>. El plásmido resultante de la recombinación fue introducido en cepas *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los plásmidos de serie pET tienen un origen de replicación ColE1, el cual confiere resistencia a ampicilina; los genes clonados fueron expresados bajo el control del promotor del bacteriófago T7. Las cepas de expresión *E. coli* BL21 (DE3) proveen de un defecto lisogeno  $\lambda$  al T7 de la RNA polimerasa, bajo la inducción de IPTG. Cada una de las inserciones del cDNA CP34, desde el vector de entrada hasta el vector de expresión, fueron confirmadas a través de PCR; utilizando el termociclador (PTC-100) con un programa de 25 ciclos donde la temperatura de desnaturalización fue 94°C por 1 minuto, para el alineamiento a 55°C por 1 minuto, la extensión a 72°C por un minuto y en la extensión final a 72°C por 7 minutos. La Mezcla para cada uno de los pasos fue la siguiente: templado de DNA 100ng en 1  $\mu$ L, amortiguador 10X 5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L, dNTP's 1.5  $\mu$ L, arrancadores de T3y T7 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L cada uno en 1  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 35.2  $\mu$ L y Taq polimerasa 1-2 U/ $\mu$ L en 0.3  $\mu$ L. Los plásmidos con inserto en los diversos pasos de la construcción, fueron recuperados de las bacterias por una preparación alcalina de DNA plasmídico pequeño (Invitrogen).

### **7.5 Expresión, purificación y concentración de la proteína CP34**

Para la expresión de la proteína recombinante, se crecieron las células transformadas BL21 DE3 con el vector pDEST-42 y el cDNA CP34 en medio LB con una concentración de ampicilina de 100µg/mL y cloramfenicol de 34 µg/mL, hasta obtener una O.D<sub>600</sub> de 0.6-1.0. Posteriormente se realizó una dilución 1:20 en medio LB con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL, hasta alcanzar una O.D<sub>600</sub> de 0.4 e iniciar así la inducción de la expresión con 1.0mM de IPTG por un tiempo de 6hrs a 37°C. Al término del período de inducción la bacteria se centrifugó a 5000 r.p.m y el botón resultante fue resuspendido en amortiguador (1X PBS, 10mM de imidazol), lisozima (1mg/mL) e inhibidores de proteasas (Leupeptina y Pepstatina 1µg/mL) a 4°C por 30 minutos. Posteriormente la muestra fue sonicada en hielo utilizando un ultrasonificador (Cole-Palmer) y el lisado obtenido se incubo con triton X100 (Sigma), RNAsa 10 µg/mL (Sigma) y DNAsa 5µg/mL (Sigma) a 4°C por 15 minutos. Esta muestra se centrifugó a 7000 r.p.m durante 15 min a 4°C, recuperando el sobrenadante y filtrándolo por membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.45 µm (Millipore). Finalmente la purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad de Ni<sup>2+</sup> en una columna de 1 mL, la proteína fue recuperada de la columna con amortiguador de imidazol a 50mM y 100mM; la concentración se realizó por medio de diálisis y liofilización.

### **7.6 Electroforesis de CP34 en geles de poliacrilamida (SDS PAGE)**

Los geles en condiciones desnaturalizantes SDS PAGE realizados para los diferentes procedimientos se prepararon al 12% y fueron corridos a 100V por un tiempo de 45 min. Los geles fueron teñidos con la solución de Coomassie y destañados con MeOH 50%, ácido acético 10%, H<sub>2</sub>O 40% hasta observar claramente las bandas que contenían las proteínas. Para la tinción de plata el gel fue sumergido en una solución de fijado de



formaldehído (metanol 40% v/v, formaldehído 0.05%, H<sub>2</sub>O 59.95%), posteriormente fue lavado dos veces durante 5 min en H<sub>2</sub>O doble destilada y sumergido en tiosulfato de sodio (0.2g/L) durante 1 minuto. El gel fue lavado nuevamente con H<sub>2</sub>O doble destilada dos veces durante 20 seg, posteriormente sumergido en la solución de AgNO<sub>3</sub> por un tiempo de 10 minutos y finalmente revelado con una solución de carbonato de sodio al 3% hasta la aparición de las bandas. Esta reacción fue detenida con una solución de ácido cítrico al 2.3M.

### **7.7 Electroelución de la proteína CP34**

La proteína CP34 fue separada del gel de poliacrilamida por medio de una cámara de electroelución del sistema Electro-Eluter (BIORAD). La proteína contenida en geles de poliacrilamida teñidos con la solución de azul de Coomassie, fue colocada en la solución de electroelución (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%) dentro de los tubos de la cámara que contenían membranas de un poro de 10 kDa, a 10mA durante 24h. Finalmente la proteína electroeluída fue resuspendida en el buffer de elución y concentrada por diálisis y liofilización.

### **7.8 Detección de la proteína recombinante por el método In Vision His-Tag In Gel Stain**

Se realizó una electroforesis con la proteína CP34 electroeluída en un gel de poliacrilamida NuPAGE al 12% a 70V. Al término, el gel fue sumergido en una solución de fijado (etanol 40%, 10% ácido acético, H<sub>2</sub>O doble destilada 50%) por 1hr. Posteriormente el gel fue lavado con agua ultrapura dos veces por 10 min e incubado inmediatamente con la solución de tinte NTA por un tiempo de 12 hrs. Finalmente el gel fue lavado con una solución amortiguadora de fosfato 20mM (pH 7.8) dos veces

por 10 min cada lavado y expuesto en un transiluminador de luz UV (FBTI-88 Fisher Scientific) unido a una cámara fotográfica digital (Kodak EDAS 290) con un filtro para bromuro de etidio; el cual fue requerido para la detección de la proteína recombinante en el gel teñido.

### **7.9 Inmunotransferencia**

El gel de electroforesis con la proteína CP34 para cada uno de los procedimientos fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (GibcoBRL) en una cámara de inmunotransferencia (BIORAD) a 63V por 2 hrs, la transferencia fue confirmada tñiendo la membrana con la solución de Ponceau S. Posteriormente la nitrocelulosa se bloqueo con leche descremada (blotto) al 5% a un pH 7.4 (Tris HCl, NaCl, leche descremada, H<sub>2</sub>O ultrapura) por 1hr en agitación a temperatura ambiente. Cada uno de los anticuerpos primarios utilizados fueron diluidos 1:500 en blotto e incubados por 12 hrs a temperatura ambiente, posteriormente la membrana fue lavada 3 veces por 10 minutos con PBS, Tween 20 al 0.3% e inmediatamente incubada con el segundo anticuerpo; cabra anti-ratón peroxidado en el caso de las membranas incubadas con anticuerpos monoclonales en una dilución 1:1000 y cabra anti-conejo para los anticuerpos policlonales diluidos 1:1000 en blotto por 1hr. Previo al revelado la membrana fue lavada con PBS, Tween 20 al 0.3%, las inmunotransferencias realizadas con anticuerpos policlonales se desarrollaron con DAB y en el caso de los anticuerpos monoclonales se revelaron por quimioluminiscencia con el sistema ECL plus (Amersham-Biosciencies). Los anticuerpos policlonales utilizados fueron anti-colágena tipo I, III y X en una dilución 1:1000 en blotto para observar una posible reacción cruzada con CP34, anti-CP34 para corroborar la producción y sensibilidad de este anticuerpo a una dilución 1:250 y por último anti-CP23 para observar reacción cruzada

en una dilución 1:500. Los anticuerpos monoclonales fueron; Anti-His (C-term) que identifica las histidinas fusionadas a la proteína recombinante para corroborar su producción en una dilución 1:1000 y el anticuerpo monoclonal cemento específico anti-CAP (3G9) para observar reacción cruzada en una dilución 1:1000.

#### **7.10 Producción y purificación del anticuerpo policlonal anti-CP34**

La proteína CP34 electroeluída fue utilizada para inmunizar a los conejos de la cepa New Zealand White subcutáneamente en el cuello, previo a la primera inmunización se obtuvo suero-preinmune de la oreja del conejo como control. La primera inmunización se realizó resuspendiendo la proteína CP34 (50µl) con el adyuvante completo de Freund en la misma cantidad. Posteriormente fueron realizadas tres inmunizaciones con 15 días de lapso entre cada una de ellas, utilizando adyuvante incompleto (50µl) y una cantidad igual de proteína recombinante. A partir de la segunda inmunización se realizó una inmunotransferencia con suero del conejo obtenido de la oreja contra CP34, para identificar los títulos del anticuerpo y así determinar el pico máximo en la producción de anticuerpo CP34. 15 días después de la última inmunización el conejo fue sacrificado por exanguinación ventricular, la sangre obtenida por este paso fue centrifugada a 10000 r.p.m. para la obtención del suero que fue almacenado a 4°C. Para la purificación de la fracción IgG del anticuerpo anti-CP34 se utilizó una columna de afinidad de (Affi-Gel Protein A) con un flujo de 1mL/min, la cual era equilibrada con el amortiguador PBS (pH 7.4) para el posterior paso del suero por la columna. Las proteínas inespecíficas fueron retiradas con PBS (pH 7.4), para que finalmente el anticuerpo eluído de la columna con glicina al 0.1M (pH 2.5) fuera neutralizado a un pH 7 con NaOH 10N. El anticuerpo obtenido fue dializado, liofilizado y almacenado a -20°C.

### **7.11 Análisis de datos**

El cDNA CP34 obtenido por el método de “panning”, se sometió a secuenciación direccional usando un secuenciador de DNA ABI Prism 377 (Dye-termination chemistry). Conociendo la secuencia del cDNA esta se sometió a su análisis en internet en programa de BLAST del NCBI, para obtener su secuencia en aminoácidos y así estimar su posible localización celular. Además de sus probables modificaciones post-traduccionales y su homología o identidad con proteínas relacionadas con el cemento radicular. En cuanto a la construcción del cDNA CP34 en el plásmido de expresión, cada paso fue analizado mediante geles de agarosa al 2% en el programa para análisis de imágenes KODAK ID Image Analysis Software y utilizando la cámara Kodak EDAS 290. De la misma forma con los geles de poliacrilamida con la proteína CP34 y las inmunotransferencias contra los diversos anticuerpos, fueron analizadas para determinar el reconocimiento de la proteína recombinante en el programa de análisis de imágenes antes mencionado. Esto con la finalidad de delimitar con exactitud la banda que correspondía a la proteína en el gel o la membrana de nitrocelulosa según fuera el experimento.

## **8. RESULTADOS**

**8.1 El cDNA CP34 contiene un codon de inicio (ATG) en el nucleótido 96 y el codon de paro (TGA) en el nucleótido 398.**

Por el método de “panning” se obtuvo un cDNA de 1394pb de la biblioteca construida en el vector  $\lambda$  ZAP Express a partir de RNAm, obtenido de células cementoblásticas. Este cDNA humano contiene un marco abierto de lectura que codifica una proteína de 101 aminoácidos. El marco abierto de lectura comienza su traducción en el ATG de inicio ubicado en el nucleótido 96 de acuerdo al consenso de la regla de Kozak

### **7.11 Análisis de datos**

El cDNA CP34 obtenido por el método de “panning”, se sometió a secuenciación direccional usando un secuenciador de DNA ABI Prism 377 (Dye-termination chemistry). Conociendo la secuencia del cDNA esta se sometió a su análisis en internet en programa de BLAST del NCBI, para obtener su secuencia en aminoácidos y así estimar su posible localización celular. Además de sus probables modificaciones post-traduccionales y su homología o identidad con proteínas relacionadas con el cemento radicular. En cuanto a la construcción del cDNA CP34 en el plásmido de expresión, cada paso fue analizado mediante geles de agarosa al 2% en el programa para análisis de imágenes KODAK ID Image Analysis Software y utilizando la cámara Kodak EDAS 290. De la misma forma con los geles de poliacrilamida con la proteína CP34 y las inmunotransferencias contra los diversos anticuerpos, fueron analizadas para determinar el reconocimiento de la proteína recombinante en el programa de análisis de imágenes antes mencionado. Esto con la finalidad de delimitar con exactitud la banda que correspondía a la proteína en el gel o la membrana de nitrocelulosa según fuera el experimento.

## **8. RESULTADOS**

**8.1 El cDNA CP34 contiene un codon de inicio (ATG) en el nucleótido 96 y el codon de paro (TGA) en el nucleótido 398.**

Por el método de “panning” se obtuvo un cDNA de 1394pb de la biblioteca construida en el vector  $\lambda$  ZAP Express a partir de RNAm, obtenido de células cementoblásticas. Este cDNA humano contiene un marco abierto de lectura que codifica una proteína de 101 aminoácidos. El marco abierto de lectura comienza su traducción en el ATG de inicio ubicado en el nucleótido 96 de acuerdo al consenso de la regla de Kozak

(AXXATGG) y el codón de paro (TGA) esta ubicado en el nucleótido 398 según los datos obtenidos en el NCBI (Figura 2).

```

1 GGCACGAGGG CAGCGGCTCT CGGGCTGCAG GCTGGGCAGG GTCCCCTCCC ACGTCCTG
61 CGCTGTCTCC CACGTCCCCC AGGTGCGCGG CCACCATGGC GTCCAGCGAC GAGGACGGCA
121 CCAACGGCGG CGCCTCGGAG GCCGGCGAGG ACCGGGAGGC TCCCGGCAAG CGGAGGCGCC
181 TGGGGTCTTT GGCCACCGCC TGGCTCACCT TCTACGACAT CGCCATGACC GCGGGGTGGT
241 TGGTCTTAGC TATTGCCATG GTACGTTTTT ATATGGAAAA AGGAACACAC AGAGGTTTAT
301 ATAAAAGTAT TCAGAAGACA CTAAATTTT TCCAGACATT TGCTTGCTT GAGGTAAGTT
361 TTCCATCATG CTGTTTTTCT ATTGCTGTAA TATTATGTG AACATTTTTT GTTGTGCAAA
421 ATCAATATGA TTTTGCTGAT TACATACCAC CTATGGATTG GCTGAATACC AATGTTGACA
481 GTGGTTTATT TAATGTTTTC TATTATTGAC GTAATGATT TTTTCTATT GCTTACAGAT
541 AGTTCACTGT TTAATTGGTG AGTTTTGCT TCAATTTTAT ACTTTTATTA TAAATTGCCT
601 TTAGGGCAAT AGTTCATTG TTTTCTTTT TAAGGAATTG TACCTACTTC TGTGATTGTG
661 ACTGGGGGTC CAAGTGAGTT CAAAAATCTT TATGGTGTGG CTCATTACTC ACAGTATAAA
721 ACCAGTAAAG GACACAAACA TGTTGCTTAC TTGAGCCTGC AGGAAAGCTT TCCATTCATA
781 GGAATCTAAA TATTAACATT TGTATATTTC AGGAGGTGGA AGTGTGGAC AAAAAGGAGT
841 TGGGTTTGAG TTTTAGATGT TGTGCATTGA CTTAGTGCCCT TAGCAGAATG ACTTTGATAC
901 ACAAAACAAAC CCAAATATTG GCATCTTAGA TCCGTAATAT ATCTCCTTT GATATTTTCC
961 AGTTTTTGAA ATCAGTATTC AGGTTCTGTC AAATAACCTG CAGAAAATGT TCTTTTCTAT
1021 AGAAGTTTCT TTTCAATCCA AGTTGTCCCT TTTGATTATG TAATCGAAGT TGTGAGTATA
1081 CAATTTATTA TTTCTGGCCA GCCGCAGTGG CCCACACCTG TAATCCCAGC ACTTTGGGAG
1141 GCCAAGGCGG GTGGATCACC TGAGGTCAGG AGTTTGAGAC CAGCCTGGCC AACATGGTGA
1201 AACCTGTTC CTAATAAAA TACAAAAATT AACAGGCGT GGGGGCAGC ACCTGGAATC
1261 CCAGCTACTC AGGAGGCCGA GGCAGAAGAA TCGCTTGAAC CCGAGAGGCA AAGGTTGCAT
1321 TGAGCTGAGA TTGTGCCTCT GCACTCCAGC CTGGGCGACA GAGCGAGACT CCGTGTGAAA
1381 AAAAAAAAAA AAAA

```

```

96 atggcgtccagcgacgaggacggcaccacggcgcgccctcggag
M A S S D E D G T N G G A S E
141 gccggcggaggaccgggaggctcccggcaagcggaggcgcctgggg
A G E D R E A P G K R R R L G
186 ttcttgccaccgcctggctcaccttctacgacatcgccatgacc
F L A T A W L T F Y D I A M T
231 gcggggtggttggttctagctattgccatggtacggtttttatarg
A G W L V L A I A M V R F Y M
276 gaaaaaggaacacacagaggtttatataaaagtattcagaagaca
E K G T H R G L Y K S I Q K T
321 cttaaattttccagacatttgccttgcttgaggtaagttttcca
L K F F Q T F A L L E V S F P
366 tcatgctgttttctattgctgtaaatatttattgta 401
S C C F S I A V I F K *

```

**Figura 2.** El cDNA de 1394pb de una línea celular derivada de un cementoblastoma humano se ubica en la parte superior, se señala el cDNA de CP34 (letras rojas) con 307pb de acuerdo con el primer marco de lectura. En la secuencia inferior se muestra el cDNA de CP34 donde se señala el codón de inicio en el nucleótido 96 y el codón de paro hasta el nucleótido 399, así como la traducción a aminoácidos.

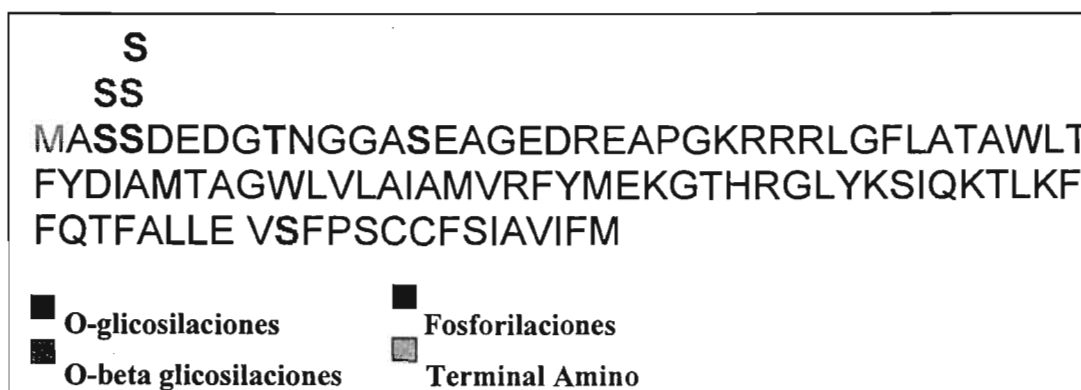
## 8.2 El cDNA CP34 codifica una proteína de 11.2kDa con 101 aminoácidos.

El cDNA CP34 codifica teóricamente una proteína de 101 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 11.2 kDa y un punto iso-eléctrico 7.78, donde la metionina en la posición 1 corresponde la terminal amino. Esta proteína en ensayos *in vitro* podría tener una vida media en células de mamíferos de 30hrs aproximadamente, 20 hrs en levaduras y 10hrs en *E. coli*. En cuanto a su composición de amino ácidos está enriquecida por alanina (11.9%), glicina (8.9), leucina (8.9), fenilalanina (8.9) y en menores cantidades con prolina (2%), asparagina (1%) e histidina (1%). (**Tabla 1**). La secuencia de CP34 a pesar de no tener péptido señal, contiene posibles modificaciones postraduccionales según los datos del NCBI (**Figura 3**); las cuales incluyen O-glicosilaciones en las serinas de la posición 3, 4 y en la treonina de la posición 9, O-beta glicosilaciones en las serinas en la posición 3, 4 y 88, además de fosforilaciones en las serinas de la posición 4, 14 y la treonina en la posición 64. No se reportan posibles fosfataciones y N-glicosilaciones en esta proteína como se puede observar en la figura 2. La predicción de la estructura secundaria de CP34 fue realizada en el sistema JUFO (Meiler), en el cual se predice que los aminoácidos de la posición 33-60, 67-86 y 94-97 podrían tener una conformación de  $\alpha$ -hélice y que los aminoácidos en las posiciones 98 a la 101 tendrían una estructura fibrilar; para el resto de la secuencia no se predice una conformación específica según el programa utilizado. Además de que teóricamente CP34 podría ser considerada como una proteína de membrana celular y no de matriz extracelular según la predicción de datos en el NCBI.

**Composición de Aminoácidos  
CP34**

Ala (A)	12	11.9%
Arg (R)	6	5.9%
Asn (N)	1	1.0%
Asp (D)	4	4.0%
Cys (C)	2	2.0%
Gln (Q)	2	2.0%
Glu (E)	6	5.9%
Gly (G)	9	8.9%
His (H)	1	1.0%
Ile (I)	5	5.0%
Leu (L)	9	8.9%
Lys (K)	5	5.0%
Met (M)	5	5.0%
Phe (F)	9	8.9%
Pro (P)	2	2.0%
Ser (S)	7	6.9%
Thr (T)	7	6.9%
Trp (W)	2	2.0%
Tyr (Y)	3	3.0%
Val (V)	4	4.0%
Asx (B)	0	0.0%

**Tabla 1. Composición de amino ácidos de CP34 en la que existe una similar cantidad de aminoácidos cargados negativamente (Asp + Glu) y aminoácidos cargados positivamente (Arg + Lys) lo que da como característica que esta proteína sea una proteína neutra (pI 7.78).**



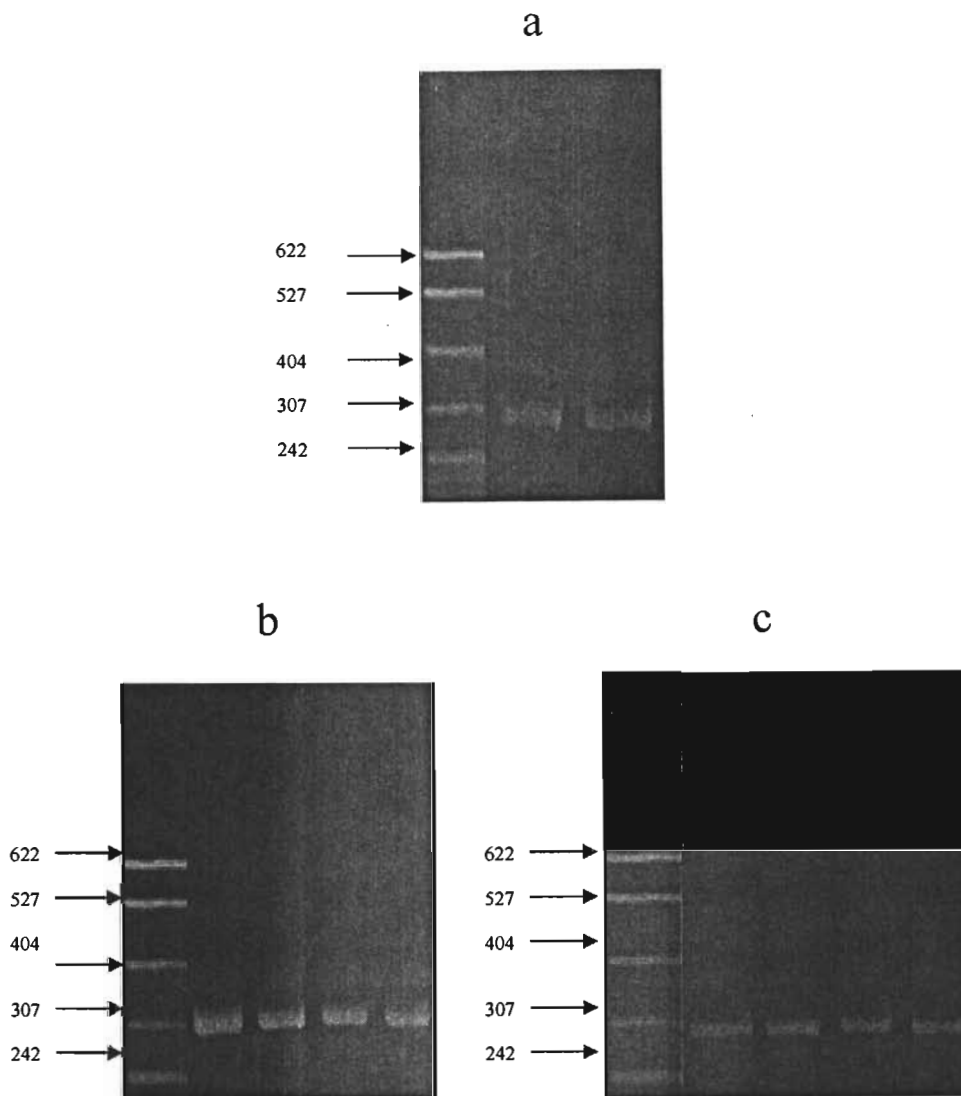
**Figura 3. La secuencia de CP34 con 101 aminoácidos y un peso de 11.2 kDa, muestra posibles dominios con modificaciones postraduccionales. Esta secuencia no predice sitios de N-glicosilación y fosfatación.**



De acuerdo al alineamiento de la secuencia de amino ácidos de CP34 con diversas secuencias del banco de datos (BLAST NCBI), esta proteína tiene una identidad del 98% con la CAP (número de acceso AY455942.1 en el GENE BANK) y un 98% de identidad con la proteína tipo tirosina fosfatasa miembro de las proteínas PTPLA en el humano (Número de acceso NM 014241.2 en el GENE BANK).

### **8.3 Construcción del cDNA de CP34 con el vector de expresión en *E. coli***

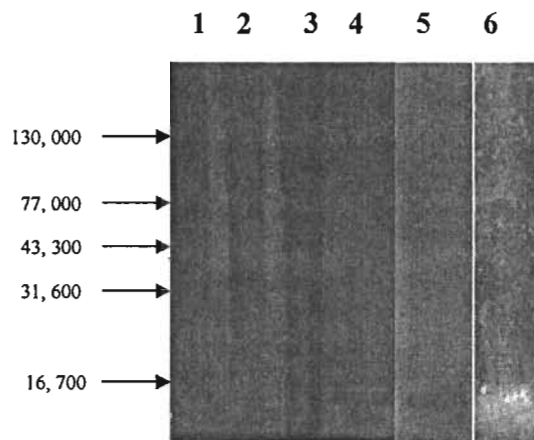
El fragmento del cDNA CP34 con 307 pb fue aislado por “panning” y clonado en el vector de entrada en células competentes de *E. coli* (TOPO 10); esto se confirmó por medio de PCR de las células transformadas, donde se observó en el gel de agarosa una banda de 306 pb correspondiente al cDNA de CP34 (**Figura 4, a**). Posteriormente el plásmido de las bacterias fue recuperado por miniprep y utilizado para la recombinación con el vector de destino (pDEST42) inducible por IPTG para su expresión; el cual proporciona la cola de histidinas a la proteína recombinante. Con este vector de destino se transformaron células competentes de *E. coli*, este paso fue igualmente confirmado por PCR de las colonias crecidas en placas con ampicilina (**Figura 4, b**). Para finalizar la construcción el plásmido de destino fue aislado y utilizado en la transformación de células de expresión *E. coli* BL21 (DE3) (**Figura 4, c**).



**Figura 4.** En esta figura se observan geles de agarosa al 1.2 % con muestras amplificadas por PCR en diferentes pasos de la construcción del cDNA CP34 en el plásmido de expresión, utilizando como marcador el DNA pBR322. En (a) se observa el fragmento amplificado (experimento por duplicado) del cDNA CP34 de 307 pb a partir de células transformadas con el vector de entrada pENTR. En (b) se encuentra el cDNA CP34 amplificado (experimento por cuadruplicado) a partir de las células transformadas con el vector de destino pDEST42 y en (c) se confirma la inserción del vector destino (experimento realizado por cuadruplicado) en células de expresión BL21 Plyss, en las cuales se realizara la inducción en la expresión de la proteína recombinante.

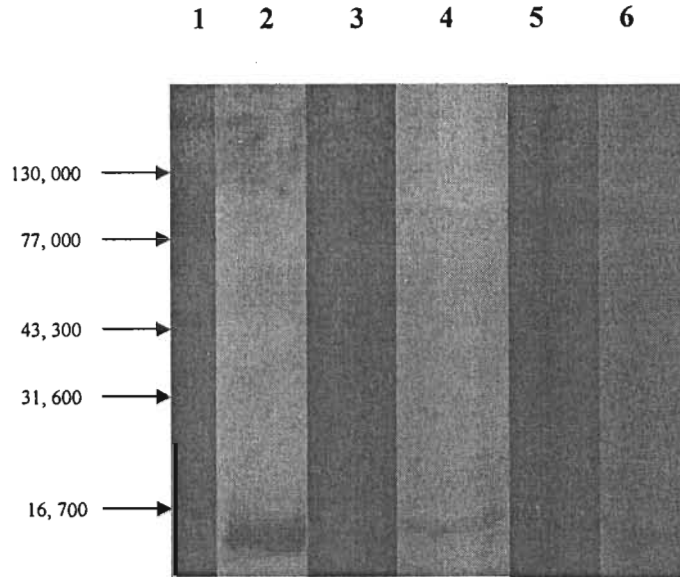
#### 8.4 La proteína CP34 expresada en *E. coli*, es reconocida en inmunotransferencia por los anticuerpos $\alpha$ -CAP, $\alpha$ -colágena tipo I y III, $\alpha$ -CP34 y $\alpha$ -CP23.

La expresión de la proteína CP34 se logró con la inducción por 2.0 mM de IPTG en las células de expresión en un tiempo óptimo de 6hrs, esta proteína se observó en el gel de poliacrilamida teñido con plata con un peso aproximado de 16kDa; debido a que la cola de histidinas le proporciona un peso adicional de 4kDa a la proteína recombinante. Por medio de inmunotransferencia con el anticuerpo  $\alpha$ -his tag y del sistema In vision His-Tag In-gel Stain se confirmó la expresión de CP34, ya que el anticuerpo y la solución a base de níquel NTA identifican la cola de histidinas adicionada a la proteína por el vector de expresión (Figura 5).



**Figura 5.** En la imagen se muestra un gel de poliacrilamida al 12% teñido con plata donde el carril 1 corresponde al marcador de mediano peso molecular (BIORAD), el carril 2 muestra el extracto de bacteria de expresión de CP 34 sin inducción con IPTG, el carril 3 a la bacteria 6hrs después de la inducción con IPTG 2Mm y el carril 4 con la proteína CP34 purificada y electroeluída en un peso aproximado de 16kDa. El carril 5 muestra la inmunotranferencia positiva de CP34 con el anticuerpo anti-Histag-COOH que confirma la identificación exacta de la proteína así como de su expresión y en el carril 6 se observa la ratificación de la expresión de CP34 por medio de sistema In Vision His-Tag In-gel Stain.

Los ensayos para el reconocimiento de CP34 por inmunotransferencia con el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -CAP específico de cemento revelado por quimioluminiscencia, demostraron que esta proteína es reconocida por este anticuerpo cemento-específico como se observa en el carril 2 de la figura 6. En el caso de la inmunotransferencia para determinar reacción cruzada de los anticuerpos policlonales para colágena tipo I, III y X con CP34, se obtuvieron diferentes resultados ya que los anticuerpos  $\alpha$ -colágena tipo I y III si tuvieron reacción cruzada con la proteína como se observa la figura 6 en los carriles 3 y 4 respectivamente; para el anticuerpo  $\alpha$ -colágena tipo X no se registró reconocimiento alguno para CP34 (dato no mostrado). Por otra parte el anticuerpo policlonal generado para el reconocimiento de CP34, reconoció con una baja sensibilidad a esta proteína ya que la dilución con la que se obtuvo este resultado fue de 1:50 en el carril 5 de la figura 6. Finalmente el anticuerpo de la proteína recombinante humana  $\alpha$ -HrCP23 tuvo una reacción cruzada de gran afinidad con la proteína recombinante como se observa en el carril 6 de la figura 6. Este último anticuerpo policlonal fue producido en conejo, a partir de inmunizaciones con una proteína derivada de tumor de cementoblastoma denominada CP23. La cual es altamente expresada en células provenientes de este tumor y ligeramente en células del PDL. Esta proteína consta de 247 aminoácidos y tiene reacción cruzada con el anticuerpo  $\alpha$ -CAP.



**Figura 6. Reconocimiento de la proteína CP34 por inmunotransferencia con diferentes anticuerpos. En el carril (1) se muestra el marcador de mediano peso molecular (BIORAD), en el carril (2) la inmunotransferencia positiva de CP34 con el anticuerpo  $\alpha$ -CAP revelado por quimioluminiscencia, en los carriles (3) y (4) resultados positivos de reacción cruzada de CP34 con anticuerpos  $\alpha$ -colágena tipo I y III respectivamente revelados con DAB. Por su parte en el carril (5) presenta la detección positiva de CP34 por el anticuerpo generado en conejo  $\alpha$ -CP34. En el carril (6) el reconocimiento del anticuerpo  $\alpha$ -CP23 a la proteína CP34. Estos últimos también revelados con DAB.**

## 9. DISCUSIÓN

A partir de la línea celular derivada de cementoblastoma humano caracterizada por Arzate *et al.*<sup>39</sup>, se aisló un cDNA de 1394 pb el cual codifica de acuerdo con su primer marco de lectura con una proteína de 101 aminoácidos con un peso aproximado de 11.2 kDa. Esta proteína denominada CP34 que deriva de una línea celular de un cementoblastoma humano tiene una identidad del 98% con la CAP según la base de datos del NCBI (número de acceso AY455942.1 en el GENE BANK) y de igual forma con la PTPLA en un 98% (número de acceso NM 014241.2 en el GENE BANK). Así la estructura secundaria de CP34 proporcionada por el programa JUF0 a partir de la secuencia de aminoácidos, pronostica predominantemente una conformación de  $\alpha$ -hélice en la gran mayoría de su secuencia compartiendo también una pequeña estructura fibrilar en la posición 98 a la 101; estos datos se podrían relacionar con CAP ya que péptidos secuenciados de esta proteína tienen principalmente una estructura de  $\alpha$ -hélice de acuerdo con los datos reportados por Wu *et al.*<sup>41</sup>. Sin embargo, es importante mencionar que CAP tiene una conformación  $\alpha$ -hélice debido a las secuencias colágenicas homologas con colágena tipo I y XII que tiene en algunos de sus péptidos internos<sup>41</sup>, lo cual no se relaciona con CP34 ya que esta proteína no tiene repeticiones Gly-X-Y característicos de los dominios colágenicos; a pesar de haber tenido reacción cruzada por las inmunotransferencia por los anticuerpos anti-colágena tipo I y III. Adicionalmente la proteína recombinante fue reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-CAP (3G9) que es cemento-específico, el cual se conoce por marcar la matriz del cemento radicular y de cementoblastos durante la formación de este tejido<sup>50</sup>. En relación con este dato, el bajo reconocimiento de CP34 por el anticuerpo policlonal generado contra esta proteína, no permitió su detección por inmunohistoquímica; lo cual nos habría delimitado que CP34 en verdad podría ser una proteína cemento-específica,

como ya lo habían propuesto los resultados que asocian a esta proteína con CAP, la cual es identificada únicamente en cemento por anticuerpos generados en los estudios de Saito *et al.* y Arzate *et al.* <sup>45,50</sup>. De tal forma, los resultados que asocian en primer plano a CP34 con CAP harían suponer que esta proteína recombinante podría participar a reserva de ensayos biológicos, en eventos similares a los llevados a cabo por la proteína de adhesión al cemento radicular; tales como la adhesión y la diferenciación de células del ligamento periodontal durante la formación del cemento radicular como lo señalan los estudios de Bar-Kana *et al.* <sup>48</sup> y Pitaru *et al.* <sup>49</sup>. Y tal vez en la mineralización del cemento radicular como lo indican los estudios realizados por Liu *et al.* <sup>46</sup> y Bar-Kana *et al.* <sup>47</sup> donde se señala que células progenitoras del periodonto que expresan CAP son formadoras de mineral del cemento. Aunque, particularmente en la adhesión celular promovida por CAP que se da gracias a una secuencia RGD <sup>43</sup>, CP34 no contiene dicha secuencia que le pudiese permitir promover adhesión celular en la cementogénesis. Sin embargo, la supuesta relación estructural de CP34 con CAP y su hipotética función como proteína de matriz extracelular, no se llevarían a cabo ya que CP34 no contiene secuencia señal y de esta manera no habría forma de que fuese transportada al exterior de la célula. Este dato importante se relaciona evidentemente con el hallazgo obtenido en la base de datos ya mencionado, donde se indica que esta proteína tiene un 98% de identidad con la secuencia de la proteína tirosina fosfatasa (PTPLA), además de que la posible localización de CP34 sería en la membrana citoplasmática de acuerdo con los datos del NCBI; por lo que la secuencia de CP34 formaría más bien parte de un receptor de membrana tipo tirosina fosfatasa, el cual tendría relevancia ya que este tipo de receptores tienen como ligandos a factores de crecimiento, conocidos por su vital importancia en la formación de tejidos duros como el cemento radicular y el hueso <sup>2</sup>. La característica estructural de estos receptores son los sitios de fosforilación importantes

para señalización intracelular, que al parecer tiene la secuencia de CP34; además de que este tipo de receptores son de una característica hidrofílica, que también según el análisis de la secuencia presenta esta proteína recombinante <sup>2</sup>. Por lo tanto la posible función de CP34 como parte de un receptor tipo tirosina fosfatasa en el cemento radicular; podría estar relacionada con la proliferación de células formadoras de mineral (cementoblastos). Como se ha demostrado en osteoblastos cultivados *in vitro* <sup>55, 56, 57</sup>, que tienen este tipo de receptores que al ser fosforilados promueven la formación de tejido mineralizado.



## 10. CONCLUSIONES

La clona de cDNA CP34 derivada de un tumor de cementoblastoma, a pesar de tener una fuerte asociación con la secuencia de la proteína CAP y de que el producto génico de dicha clona fuese reconocido por inmunotransferencia por el anticuerpo  $\alpha$ -CAP; CP34 no pertenece a la especie CAP ya que su secuencia no contiene secuencia señal, además de carecer de repeticiones colagenicas, así como de una secuencia RGD. Por lo que la ausencia de estas características, le impediría funcionar como una proteína de matriz extracelular con propiedades de fomentar la adhesión celular, migración celular formación de tejido mineral durante la cementogenesis como las que si promueve CAP. Con lo que con mayor probabilidad esta proteína podría ser parte de un receptor tipo PTPLA, ya que presenta gran homología con este receptor. Además de tener una secuencia hidrofílica, con probables sitios de fosforilación relacionados con los receptores PTPLA; además de que su probable localización en la célula sea la membrana citoplasmática según los datos del NCBI. Por lo que su asociación con la cementogenesis, podría quedar enmarcado a reserva de estudios complementarios en la señalización intracelular involucrada en la formación de tejido mineral como ya se demostró con osteoblastos.

Así el modelo de células de cementoblastoma (cementoblastos) es una alternativa viable con la que se pueden aislar, expresar y caracterizar nuevos factores o proteínas sean o no cemento específicos, que pudiesen participar en los procesos de la cementogénesis y la regeneración del tejido.

## **11. BIBLIOGRAFÍA**

- 1.-Lindhe J. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. En: Karring K, Lang KP, editores. Editorial Médica Panamericana. España; 2003: 19-67.
- 2.-Saygin NE, Giannobile WV, Somerman M. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology* 2000 2000; 24: 73-98.
- 3.-Birkedal. Hansen H, Butler WT, Taylor RE. Proteins of the periodontium. Characterization of the insoluble collagens of bovine cementum. *Calc Tissue Res* 1977; 23: 39.
- 4.-Page RC, Babb DA. A new look at the etiology and pathogenesis of early-onset periodontitis. *Cementopathia revisited. J Periodont* 1985; 56: 748.
- 5.-Garret S. Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol* 1996; 1: 621-666.
- 6.-MacNeil RL, Somerman MJ. Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrast. *Periodontol* 2000 1999; 19: 8-20.
- 7.-Schoroeder HE. Human cellular mixed stratified cementum: a tissue with alternating layers of acellular extrinsic- and cellular intrinsic fiber cementum. *Scweiz Monatsshr Zahnmed* 1993; 103: 550.
- 8.- Macneil RI, Berry JE, Strayhorn CL, Shigeyama Y, Somerman MJ. Expression of type I and XII collagen during development of the periodontal ligament in the mouse. *Arch Oral Biol.* 1998; 43: 779-787.
- 9.-Tenorio D, Cruchley A, Hugues FI. Immunocytochemical investigation of the rat cementoblast phenotype. *J Periodontal Res* 1993; 28:411-419.
- 10.-Urias SE, Gluhak J, Ramirez L, Goldman E, Pavlin D. Effect of mechanical stress on bone markers in celullar cementum. *J Dent Res* 1999; 78: 500.
- 11.-Rao LG, Wang HM, Kalliecharan R, Heersche JN, Sodek J. Specific immunohistochemical localization of type I collagen in porcine periodontal tissues using the peroxidase labelled antibody technique. *Histochem J* 1979; 11: 73.
- 12.-Becker J, Schuppan D, Rabanus JP, Rauch H, Niechey U, Gelderblom HR. Immunoelectron microscopic localization of collagens type I, V and VI and procollagen type III in human periodontal ligament and cementum. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 103.
- 13.-Cheng H, Catterson B, Neame PJ, Lester G, Yamauchi M. Differential distribution of lumican and fibromodulin in tooth cementum. *Connect Tissue Res* 1996; 34: 87.
- 14.-Matias MA, Li H, Young WG and Bartold PM. Immunohystochemical localization of fibromodulin in the periodontium during cementogenesis and root formation in the rat molar. *J Periodont Res* 2003; 38: 502-507.

- 15.-Bartold PM. A biochemical and immunohistochemical study of the proteoglycans of alveolar bone. *J Dent Res* 1990; 69: 7.
- 16.- Nanci A. Content and distribution of Non-collagenous Matrix Proteins in bone and Cementum: Relationship to Speed of Formation and Collagen Packing Density. *J Struct Biol* 1999; 126: 256-269.
- 17.-Chen J, Mc Culloch CAG, Sodek J. Bone sialoprotein in developing porcine dental tissue: cellular expression and comparison of tissue localization with osteopontin and osteonectin. *Arch Oral Biol* 1993; 38: 241-249.
- 18.-Mac Neil RL, Berry JE, D'errico J, Strayhorn CL, Somerman MJ. Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis. *Arch Oral Biol* 1996; 41:827-835.
- 19.- Somerman MJ, Sauk JJ, Foster RA, Norris K, Dickerson K, Argraves WS. Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodontal Res* 1991; 26:10-16.
- 20.-Mac Neil RL, Berry JE, D'errico JA, Strayhorn CL, Piotrowski B, Somerman MJ. Role of tow mineral –associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein during cementogenesis. *Connect Tissue Res* 1995; 33: 17.
- 21.-Hunter GK, Kyle CI, Golberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* 1994; 300: 723-728.
- 22.-Ouyang H, Franceschi RT, McCauley L, Wang D and Somerman M. Parathyroid hormone-related protein down- regulates bone sialoprotein gene expression in cementoblast: role of the protein kinase, a pathway. *Endocrinology* 2000; 141: 4671-4680.
- 23.-Chen D, Zhao M and Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22(4): 233-241.
- 24.- Aberg T, Wozney J, Thesleff I. Expresión patterns of bone morphogenic proteins (BMP's) in the devloping Mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell diffrentiation. *Den Dyn* 1997; 210: 383-393.
- 25.- King GN, Hughes FJ. Bone Morphogenetic protein -2 stimulates cell recruitment and cementogenesis during early wound healing. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 465-475.
- 26.-Cheng C, Colucci C, Grano M, Zigrino P, Battolo L, Zambonin G, Baldini N, Vergnaud P, Delmas PD, Zallone AZ. Osteocalin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins and calcium-mediated intracelullar signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol* 1994; 127: 1149-1158.

- 27.-Bronkers ALJJ, Farach-Carson MC, Waveren EV, Butler WT. Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentón sialoprotein during root formation and early cementogenesis in the rat. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 833-841.
- 28.-Kagayama M, Li HC, Zhu J, Sasano Y, Htakeyama Y, Mizoguchi I. Expression of osteocalcin in cementogenesis in cementoblast forming acellular cementum. *J Periodont Res* 1997; 32: 273-278.
- 29.-Sengupta S, Shoulin FE, Slomiang A, Slominag BL. Identification of laminina receptor in gingival tissue and its interaction with tooth cementum. *Int J Biochem.* 1991; 23(1):115-21.
- 30.-Matias MA, Li H, Young WG, Bartold PM. Immunohistochemical localisation of extracellular matrix proteins in the peridontium during cementogenesis in the rat molar. *Arch Oral Bio* 2002; 48: 709-716.
- 31.- Hashimoto F, Kobayashi Y, Kobayashi ET, Sakai E, Kobayashi K, Shibata M, Kato Y and Hideaki S. Expression and localization of MGP in rat tooth cementum. *Arch Oral Biol* 2001; 46:585-592.
- 32.-Beertsen W, VandenBos T, Everts V. Root developmental in mice lacking functional tissue non-specific alkaline phosphatase gene: inhibition of acellular cementum formation. *J Den Res* 1999; 78: 1221-1229.
- 33.- van de Bos T, Beertsen W, Alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament: age affect and relation to cementum growth rate. *J Periodont Res* 1999; 34: 1-6.
- 34.-Thesleff I, Sharpe P. Signaling network regulating dental development. *Mech Dev* 1997; 67: 111-123.
- 35.-Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, Meneses JJ, Christensen L, Sharpe PT, Presley R, Pedersen RA, Rubenstein JLR. Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches mutations of Dlx-1, Dlx 2 and Dlx-2 alters morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol* 1997; 185: 165-184.
- 36.-Price JA, Bowden DW, Wrigth JT, Pettenati MJ, Hart TC. Identification of mutation in DLX3 associated with trichodonto-osseos (TDO) syndrome. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 563-569.
- 37.-Lezot F, Davideau JL, Thomas B, Sharpe P, Forest N, Ariane B. Epithelial Dlx-2 homeogene expression and cementogenesis. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 277-283.
- 38.-Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan AS. Cellular origins and differentiation control mechanism during periodontal developmental and wound healing. *J Periodont Res* 1994; 29: 81.
- 39.-Arzate H, Olson SW, Page RC, Narayanan AS. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture. *Bone Miner* 1992; 18:15.

- 40.-D'errico JA, Macneil RL, Takata T, Berry J, Strayhorn, Somerman MJ. Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, in situ and in vitro. *Bone* 1997; 20: 117-126.
- 41.-Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 686-692.
- 42.- Ogata Y, Niisato N, Moriwaki K, Yokota Y, Foruyuma S, Sugiya. Cementum, Root Dentin and Bone Extracts Stimulate Chemotactic Behavior in Cells from Periodontal Tissue. *Comp Biochem Physiol.* 1997; 116: 359-365.
- 43.-Pitaru S, Savion N, Hkemat M. Molecular and cellular interaction of a cementum attachment protein with periodontal cells and cementum matrix components. *J Periodont Res* 1993; 28; 560-562.
- 44.-Mc Allister B, Narayanan SA, Miki Y. Isolation of a fibroblast protein attachment from cementum. *J. Periodont Res* 1990; 25: 95-105.
- 45.-Arzate H, Olson S, Page RC. Production of monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J.* 1992; 6: 2990-2995.
- 46.-Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan S, Pitaru A. A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1691-1699.
- 47.-Bar-Kana I, Savion N, Narayanan AS, Pitaru. Cementum attachment protein manifestation is restricted to the mineralized tissue forming cells of the periodontium. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 357-64.
- 48.- Barkana I, Narayanan AS, Grosskop A, Savion N, Pitaru S. Cementum attachment protein enriches putative cementoblastic populations on root surfaces in vitro. *J Dent Res.* 2000 Jul; 79: 1482-8.
- 49.- Pitaru S, Narayanan SA, Olson S, Savion N, Hekmati H, Alt I, Metzger Z. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodont Res* 1995; 30: 360-368.
- 50.-Saito M, Iwase M, Maslan N, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Teranaka T, and Narayanan S. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine Tooth Germ during cementogenesis. *Bone* 2001; 29: 242-248.
- 51.-Saito M and Narayanan S. Signaling reactions induced in human fibroblast during adhesion to cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res* 1999;14 : 65-72.
- 52.-Yonemura K, Narayanan AS, Miki Y, Page RC, Okada H. Isolation and partial characterization of a grow factor from human cementum. *Bone Miner* 1992; 18:15-30.

- 53.- Ikezawa K, Hart CE, Williams DC, Narayanan AS. Characterization of cementum derived grow factor as an insulin-like growth factor-like molecule. *Connect Tissue Res.* 1997;36 (4):309-19.
- 54.-Wisocky LJ, Sato VL. "Panning" for lymphocytes: a method for cell selection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Jun; 75(6): 2844-8.
- 55.-Chaudhary LR, Avioli LV, Activation of extracelullar signal regulated kinases 1 and 2 (ERK and ERK2) by FGF-2 and PDGF-BB in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: differences in mobility and in-gel renaturation of ERK in human, rat and mouse osteoblastic cells. *Biophys Res Commun* 1997; 238: 134-139.
- 56.-Ostman A and Bohmer F. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends in cell biology* 2001; 6: 258-266.
- 57.-Okasaki M, Takahashi Y, Linda K, Okimura Y, Kaji H, Abe H and Chihara K. growth hormone stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p (125FAK) and actin stress fiber formation in human osteoblast- like Cells, Saos2. *Biochem and Biophyl Res Comm* 1999; 263 : 100-106.