



**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**

**“EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL  
CEMENTO RADICULAR HUMANO (*hr*CAP/PTPLA) EN UN SISTEMA  
PROCARIONTE Y SU EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN EN TEJIDOS HUMANOS”**

**T E S I S**

**QUE PRESENTA:**

**M. en C. ANA ELISA VALDES DE HOYOS**

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

**TUTOR:**

**DR. HIGINIO ARZATE**

**México, D.F. Ciudad Universitaria, Junio 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Comité Tutoral, al Dr. Higinio Arzate, al Dr. Javier Portilla Robertson, a la Dra. Elba Rosa Leyva Huerta, al Dr. Javier Ambrosio Hernández, y a la Dra. Gabriela Mercado Celis por su apoyo, guía y disponibilidad para la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Patricia Margarita Tato Zaldivar, a la Dra. Ana María Fernández Presas, a la Dra. Laurie Ann Ximenez Fyvie, al Dr. Luis Felipe Jiménez García, y al Dr. Juan Carlos Hernández Guerrero por sus valiosas aportaciones al trabajo.

A mis padres Eduardo y Ana, y a mi hermana Elena por su amor y apoyo incondicional brindado.

Y a mis compañeros y amigos del laboratorio por sus sugerencias en la realización de este trabajo y por su amistad.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| Agradecimientos.....                                   | ii |
| Lista de Figuras.....                                  | iv |
| Abreviaturas.....                                      | v  |
| <br>   |    |
| 1. RESUMEN.....  | 8  |
| 2. ABSTRACT .....                                      | 10 |
| 3. INTRODUCCIÓN.....                                   | 11 |
| 4. ANTECEDENTES .....                                  | 12 |
| 4.1. Cemento .....                                     | 12 |
| 4.1.1. Definición.....                                 | 12 |
| 4.1.2. Desarrollo del Cemento .....                    | 12 |
| 4.1.3. Clasificación del Cemento Radicular .....       | 14 |
| 4.1.4. Composición Bioquímica del Cemento .....        | 17 |
| 4.1.5. Destrucción del cemento .....                   | 19 |
| 4.2. Gen <i>CAP/PTPLA</i> .....                        | 21 |
| 4.2.1. Proteína <i>CAP/PTPLA</i> .....                 | 24 |
| 4.2.2. Localización espacial de <i>CAP/PTPLA</i> ..... | 25 |
| 4.2.3. Funciones de <i>CAP</i> .....                   | 26 |
| 4.3. Proteína Recombinante .....                       | 28 |
| 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....                    | 29 |
| 6. HIPÓTESIS. ....                                     | 31 |
| 7. OBJETIVOS .....                                     | 31 |
| 8. MATERIALES Y METODOS .....                          | 32 |
| 9. RESULTADOS .....                                    | 40 |
| 10. DISCUSION.....                                     | 49 |
| 11. CONCLUSION.....                                    | 54 |
| 12. BIBLIOGRAFIA.....                                  | 55 |

## Lista de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Micrografías electrónicas de cemento humano. ....  | 15 |
| Figura 2. Cementoblastos en cultivo. ....  | 16 |
| Figura 3. Secuencia de nucleótidos y de amino ácidos de PTPLA.....   | 22 |
| Figura 4. ARN mensajero CAP/PTPLA. ....  | 23 |
| Figura 5. Secuencia de aminoácidos de las isoformas CAP/PTPLA y PTPLA del gen<br>PTPLA. ....                                       | 25 |
| Figura 6. Caracterización de la proteína hrCAP/PTPLA. ....   | 41 |
| Figura 7. Inmunotrasferencia con los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA..   | 42 |
| Figura 8. Inmunofluorescencia de células derivadas de tejidos periodontales<br>humanos.....  | 43 |
| Figura 9. Inmunohistoquímica de tejidos periodontales humanos incubados con los<br>anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA. .... | 44 |
| Figura 10. Inmunolocalización de CAP/PTPLA en diversos tejidos humanos. ....   | 45 |
| Figura 11. Líneas celulares periodontales humanas (QTRT-PCR). ....   | 47 |
| Figura 12. Hibridación <i>in situ</i> de tejidos periodontales humanos.....  | 48 |

## ABREVIATURAS

|           |   |
|-----------|---|
| AAC       | Cemento Acelular Afibrilar<br>Acellular Afibrillar Cementum   |
| AEFC      | Cemento Acelular de Fibras Extrínsecas o cemento primario<br>Acellular Extrinsic Fiber Cementum   |
| AIFC      | Cemento Acelular de Fibras Intrínsecas<br>Acellular Intrinsic Fiber Cementum  |
| ALP       | Fosfatasa Alcalina<br>Alkaline Phosphatase  |
| BMP       | Proteína de la matriz del Hueso<br>Bone Morphogenetic Protein   |
| BSP       | Sialoproteína Ósea<br>Bone Sialoprotein   |
| CAP       | Proteína de Adhesión del Cemento Radicular<br>Cementum Attachment Protein   |
| CAP/PTPLA | Proteína de Adhesión del Cemento Radicular/Proteínas Tirocinas parecidas a las Fosfatasas con prolina en lugar de arginina<br>Cementum Attachment Protein/Protein Tyrosine Phosphatase-like A |
| CEMP1     | Proteína del Cemento 1<br>Cementum Protein 1  |
| CIFC      | Celular de Fibras Intrínsecas o cemento secundario<br>Cellular Intrinsic Fiber Cementum   |

|       |   |
|-------|---|
| CGF   | Factor de Crecimiento del Cemento<br>Cementum Growth Factor                             |
| CMSC  | Cemento Mixto Celular Estratificado<br>Cellular Mixed Stratified Cementum               |
| DMEM  | Medio modificado de Dulbecco's<br>Dulbecco's Modified Eagle Medium                      |
| EDTA  | Ácido etiletilendiaminotetraacético   |
| ERK2  | Cinasa 2 regulada por señales extracelulares<br>Extracellular signal-regulated kinase 2 |
| FG    | Fibroblastos gingivales   |
| FGF   | Factor de crecimiento de fibroblastos<br>Fibroblast Growth Factor                       |
| GAPDH | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa<br>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase     |
| HA    | Hidroxiapatita  |
| HCl   | Ácido clorhídrico   |
| HERS  | Vaina epitelial radicular de Hertwig's<br>Hertwig's Epithelial Root Sheath              |
| IGF-I | Factor de crecimiento insulínico I<br>Insuline Growth Factor 1                          |
| IPTG  | Isopropil-β-D-tiogalactósido  |
| LB    | Medio Lisogénico  |
| MAPK  | Proteína cinasa activada por mitógenos<br>Mitogen-activated protein kinase              |

|             |  |
|-------------|--|
| ME          | Matriz Extracelular  |
| MgCl        | Cloruro de magnesio  |
| NaCl        | Cloruro de sodio   |
| OPN         | Osteopontina   |
| OCN         | Osteocalcina   |
| PDGF        | Factor de crecimiento derivado de plaquetas<br>Platelet-derived growth factor  |
| PFA         | Parafolmadehído  |
| PMSF        | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo<br>Phenylmethylsulfonyl fluoride   |
| PTPasa      | Proteínas Tirosinas Fosfatasas<br>Protein Tyrosine Phosphatase   |
| PTPL        | Proteínas Tirosinas parecidas a las Fosfatasas<br>Protein Tyrosine Phosphatase-like                                    |
| PTPLA       | Proteínas Tirosinas parecidas a las Fosfatasas con prolina en lugar de arginina<br>Protein Tyrosine Phosphatase-like A |
| SSC         | Solución de citratos de sodio  |
| SDS         | Dodecilsulfato sódico  |
| TBS         | Buffer Tris salino   |
| TBST        | Buffer Tris salino con Tween   |
| TBSTM       | Buffer Tris salino con Tween y leche   |
| TEA         | Trietanolamina   |
| TGF $\beta$ | Factor de crecimiento de transformación $\beta$<br>Transcription Growth Factor $\beta$                                 |



## 1. RESUMEN

El cemento es un tejido mineralizado que cubre las raíces dentales y sirve de anclaje para las fibras del ligamento periodontal a fin de mantener los dientes en los alveolos. En la enfermedad periodontal, particularmente, en la periodontitis, la destrucción del cemento radicular como consecuencia de la acción bacteriana, aunado a la falta de formación del mismo incluso después de la aplicación de terapias periodontales resulta en la incapacidad de las fibras del ligamento periodontal para unirse a la superficie radicular y por consiguiente, en la pérdida del órgano dentario. Se ha sugerido que, las proteínas cementoides usadas en la terapia periodontal podrían generar mejores resultados que las terapias periodontales convencionales y así, evitar la pérdida dental. CAP/PTPLA es una proteína al parecer específica de cemento y caracterizada por promover de forma selectiva la migración y adhesión de células con características mineralizantes a partir de una población de células heterogéneas del ligamento periodontal.

Para comprobar que la proteína CAP/PTPLA es una molécula asociada al cemento radicular humano y un marcador biológico de este tejido, la secuencia de ADNc que codifica para la misma se expresó en células *E.coli* y la proteína recombinante resultante (hrCAP/PTPLA) se utilizó para la producción de anticuerpos policlonales. El ARNm de CAP/PTPLA de tejidos periodontales humanos se analizó con Hibridación *in situ* y el de células derivadas de cementoblastos, ligamento periodontal y osteoblastos con QRT-PCR. La proteína CAP/PTPLA de células derivadas de cementoblastos, ligamento periodontal, osteoblastos y fibroblastos gingivales humanos se detectó a través de Inmunotrasferencia e inmunocitoquímica, mientras que la de tejidos periodontales y no periodontales con inmunohistoquímica. Nuestros resultados mostraron que el ARNm de CAP/PTPLA se expresó en cementoblastos, en células paravasculares, en subpoblaciones del ligamento periodontal, y en el hueso alveolar, mientras que los anticuerpos policlonales contra hrCAP/PTPLA la identificaron tanto en tejidos periodontales como en tejidos no periodontales. Estos datos indican que CAP/PTPLA no es un marcador biológico del cemento radicular humano; sin embargo, no descartan la posibilidad de que CAP/PTPLA pueda jugar un papel importante en la diferenciación de los

cementoblastos durante la cementogénesis, además, permiten enriquecer la información existente sobre las moléculas que regulan la formación de los tejidos periodontales durante el desarrollo y la regeneración y por ende, puedan constituir un punto de partida para la elaboración de terapias periodontales fiables.

## 2. ABSTRACT

Cementum is a mineralized connective tissue that covers the teeth root surfaces and is the structure where the periodontal ligament fibers are inserted to maintain the teeth into the alveolar sockets. During periodontitis, the destruction of cementum as a consequence of bacteria deposition, and the absence of new cementum formation even after periodontal treatment result in failure of periodontal ligament fibers to insert into cementum. It has been suggested that, the use of cementum proteins in periodontal therapies could lead to better outcomes than those of conventional periodontal therapies, thus preventing tooth loss. CAP/PTPLA appears to be a cementum specific protein and it is known to selectively promote the migration and adhesion of cells with a mineralizing phenotype from a heterogeneous population.

In order to test whether CAP/PTPLA is a human cementum-associated molecule and a biological marker of this tissue, its cDNA coding sequence was cloned and expressed in *E.coli* and its recombinant protein (hrCAP/PTPLA) was used for the production of polyclonal antibodies against it. Expression of CAP/PTPLA transcripts in human periodontal tissues was analyzed by ISH, while that of human cementoblasts, periodontal ligament and alveolar bone-derived cells was determined by QRT-PCR. The identification of CAP/PTPLA protein in human cementoblasts, periodontal ligament, alveolar bone and gingival fibroblast-derived cells was determined by Western Blot and immunocytochemistry, while that of periodontal and non-periodontal tissues was identified with immunohistochemistry. Our results showed that the *CAP/PTPLA* mRNA was expressed in cementoblasts, paravascular cells, periodontal ligament cells, and alveolar bone cells. The CAP/PTPLA protein was detected both in periodontal and non-periodontal tissues. These data demonstrate that CAP/PTPLA is not a human cementum biological marker; however, they do not reject its possible role in cementoblast differentiation during cementogenesis. In addition, they provide an insight into the molecules that regulate the formation of the periodontium during development and regeneration, which may be useful in the establishment of more reliable therapies for the regeneration of periodontal tissues.

### 3. INTRODUCCIÓN

El cemento radicular es un tejido conectivo calcificado que cubre la dentina radicular y sirve de anclaje para las fibras del ligamento periodontal.

A nivel bioquímico, está compuesto por moléculas como la hidroxiapatita, las fibras de colágena I y III, y por las glucoproteínas sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), y osteocalcina (OCN), que son compartidas por otros tejidos mineralizados; así como, por tres proteínas consideradas específicas de cemento entre las que destaca la Proteína de Adhesión del Cemento Radicular (CAP). Esta proteína induce la adhesión, migración y mineralización de células derivadas de tejidos periodontales.

Por otro lado, el cemento puede sufrir destrucción debido a una enfermedad denominada periodontitis que resulta de la susceptibilidad o resistencia del huésped a bacterias patógenas. En la periodontitis, al igual que el cemento, el hueso y el ligamento periodontal son destruidos, y se intentan reestablecer con terapias periodontales que desgraciadamente, en la actualidad no logran la formación completa de los mismos. Por lo que, se sugiere que una proteína propia del cemento podría favorecer la formación del mismo, e inducir la migración y diferenciación de células progenitoras de hueso y de ligamento periodontal.

Esta investigación se realizó para comprobar si la proteína CAP, también denominada PTPLA, es un marcador de cemento radicular ya que, de ser así, podría emplearse como una alternativa a las terapias periodontales, a fin de promover la regeneración de los tejidos perdidos a causa de la periodontitis, y en el caso del cemento proveer el sitio de anclaje para las fibras del ligamento periodontal.

La investigación narra la construcción de una proteína recombinante a partir del ADNc que codifica para CAP, a fin de crear anticuerpos policlonales que permitan determinar la localización de la proteína CAP en cortes de tejidos periodontales y no periodontales humanos. Además de, describir los experimentos que permiten detectar el ARNm del gen CAP en cortes de tejidos humanos.

## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1. Cemento**

#### **4.1.1. Definición**

El cemento es el tejido conectivo calcificado no uniforme que, cubre la dentina radicular y sirve de anclaje para las fibras colágenas del ligamento periodontal y para los tejidos conectivos gingivales (Arzate *et al*, 1992a; Thomas, 1995; Saito *et al*, 2001).

De ahí que, a pesar de formar parte anatómica del diente, su función está relacionada con la inserción del periodonto, por lo que también se considera componente de este último. Sus funciones adaptativas y reparativas juegan un papel importante en el mantenimiento de la relación oclusal y en la integridad de la superficie radicular (Bosshardt y Selvig, 1997).

#### **4.1.2. Desarrollo del Cemento**

La cementogénesis tiene dos fases, la prefuncional y la funcional. La primera ocurre durante la formación de la raíz en etapas pre-eruptivas; mientras que la segunda comienza cuando el diente alcanza el nivel oclusal y el cemento celular está formado. Esta segunda fase continúa durante toda la vida y se asocia a procesos adaptativos y reparativos que determinan los distintos tipos de cemento.

Durante la formación de la raíz, el Epitelio Interno y el Epitelio Externo del esmalte se unen a nivel cervical para formar la vaina epitelial radicular de Hertwig's (HERS), la cual prolifera y migra apicalmente a través del tejido ectomesenquimatoso dividiéndolo en papila dental y folículo dental (Bosshardt y Selvig, 1997; Zeichner-David *et al*, 2003; Luan *et al*, 2006).

El epitelio interno del órgano del esmalte de HERS induce a las células adyacentes de la papila a polarizarse y a diferenciarse hacia odontoblastos que producirán predentina (MacNeil y Thomas, 1993a). Posteriormente, HERS empieza a desintegrarse en sus zonas más cervicales (Gottlieb, 1942) y, de acuerdo a la teoría mesenquimatosa o clásica, células del folículo dental de origen ectomesenquimatoso (Chai *et al*, 2000) inducidas por HERS (Orban, 1996; Paynter y Pudy, 1958) se diferencian a pre-cementoblastos (Diekwisch, 2001) y extienden sus procesos entre las fenestraciones de HERS para acceder a la superficie no mineralizada de la dentina radicular (Thomas, 1995). Estos pre-cementoblastos una vez diferenciados a cementoblastos secretan matriz de cemento sobre la superficie radicular (Diekwisch, 2001).

Tan pronto como las células de HERS fenestran, algunas de ellas se alejan de la raíz en dirección hacia la futura zona del ligamento periodontal donde se reasocian y forman los restos epiteliales de Malassez (Zeichner-David *et al*, 2003); las células que permanecen en la superficie (Thomas, 1995) se cree regulan la cantidad de cemento acelular depositado (MacNeil y Thomas, 1993b). Durante la segunda fase de la cementogénesis la proliferación de HERS se reduce considerablemente y algunas células quedan atrapadas en la capa de cemento en formación (Thomas, 1995; Luan *et al*, 2006). Otra posibilidad a considerar para las células de HERS es que experimentan apoptosis (MacNeil y Thomas, 1993b).

La teoría sobre el origen epitelial de los cementoblastos (Diekwisch, 2001) establece que, una vez formada la dentina radicular, HERS sintetiza y secreta cemento (Luan *et al*, 2006), o bien, que sintetiza una matriz de proteínas relacionadas con las del esmalte a lo largo de las superficies radiculares en formación (Slavkin *et al*, 1988) la cual, una vez fragmentada HERS, tiene la capacidad de estimular al ectomesénquima a diferenciarse a cementoblastos y a formar cemento acelular (Slavkin *et al*, 1988; Lin *et al*, 2008).

Es de notar que, mientras algunos experimentos sustentan el origen epitelial de la cementogénesis en presencia de HERS (Slavkin *et al*, 1988,1989), algunos otros lo

hacen en ausencia de HERS, lo que ha creado confusión y ha llevado a sugerir la transformación epitelio-mesenquimatosa de HERS hacia cementoblastos (Thomas, 1995; Ten Cate, 1996). En este tenor, los tonofilamentos rudimentarios y desmosomas en células parecidas a los cementoblastos se consideran rasgos distintivos de origen epitelial, y por consiguiente, las células que carecen de rasgos epiteliales (cementoblastos) que se encuentran entre células con características epiteliales podrían haber completado la transformación epitelio-mesenquimatosa (Bosshardt y Nanci, 2004). Además, el hecho de que durante la formación inicial del cemento no todas las células epiteliales de HERS se alejan de la raíz apoya el concepto de que los cementoblastos tienen origen epitelial (Ten Cate, 1996).

#### **4.1.3. Clasificación del Cemento Radicular**

El cemento se clasifica en base a su localización, estructura, función, composición química, velocidad de formación, y grado de mineralización. Éste se denomina celular, acelular, fibrilar o afibrilar dependiendo de la presencia o ausencia de células y fibras de colágena. La localización de los distintos tipos de cemento puede variar de diente a diente y aún en un mismo diente (Yonemura *et al*, 1992; Bosshardt y Selvig, 1997). Por lo tanto, los distintos tipos de cemento comprenden:

**1) Cemento Acelular Afibrilar (AAC).**- se localiza en áreas aisladas sobre el esmalte y la dentina a lo largo de la unión cemento-esmalte (Schroeder, 1988). No participa en el anclaje del diente. Probablemente, es una desviación a la norma más que un tejido indispensable (Bosshardt y Selvig, 1997; Bosshardt *et al*, 2005). Existe controversia en cuanto a su origen epitelial o mesenquimatoso (Bosshardt y Selvig, 1997).

**2) Cemento Acelular de Fibras Extrínsecas o cemento primario (AEFC).**- recorre desde la región cervical hasta 2/3 de la raíz (Thomas, 1995), con un grosor de 50 a 250µm (Schroeder, 1988). Sirve de anclaje a las fibras del ligamento periodontal (fibras de Sharpey) y su rápido crecimiento le confiere potencial adaptativo

(Schroeder, 1988). Se forma gracias al depósito de fibras de colágena por parte de fibroblastos (Yamamoto *et al*, 2001).

### 3) Cemento Celular de Fibras Intrínsecas o cemento secundario (CIFC).-

se encuentra en las zonas donde no hay AEFC, es decir, en el tercio apical y en bifurcaciones (algunas veces coronalmente) (Thomas, 1995).

Es un cemento adaptativo y principalmente, reparativo (Schroeder, 1988). La formación del CIFC comienza con la diferenciación de pre-cementoblastos a cementoblastos. Estos últimos, son células largas basofílicas de núcleo rico en eucromatina y abundante retículo endoplásmico, que extienden numerosos procesos citoplasmáticos hacia la matriz dentinaria en donde secretan matriz no mineralizada y también matriz colagénica (fibras intrínsecas) en las cuales ocurre la mineralización (Bosshardt y Selvig, 1997) (Fig. 1-2).

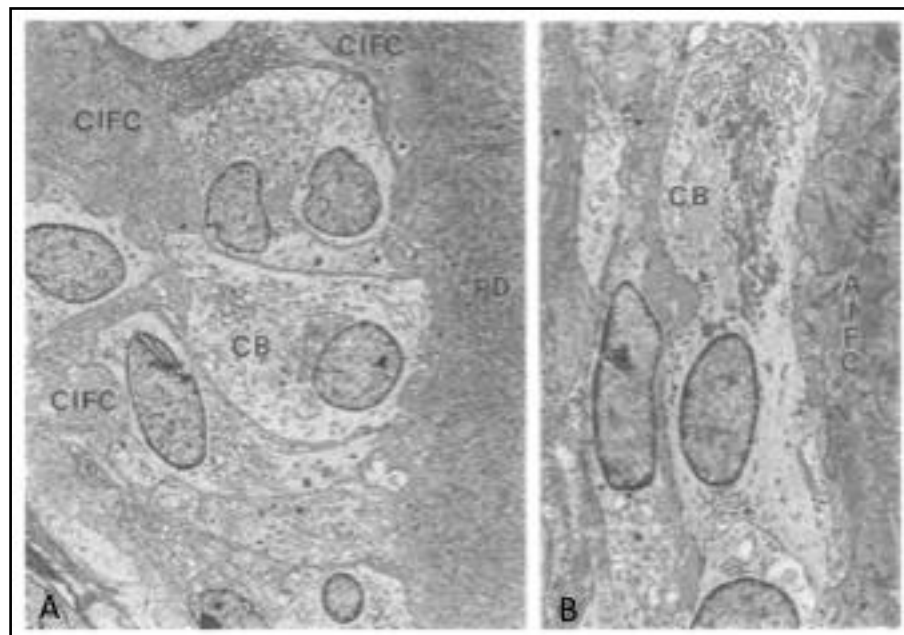


Figura 1. Micrografías electrónicas de cemento humano.

A) Cementoblasto (CB) secretorio mostrando un núcleo rico en eucromatina y un retículo endoplásmico abundante. El cementoblasto está rodeado por la matriz cementoide que produce. B) La matriz de cemento celular de fibras intrínsecas (CIFC) se continúa con el cemento acelular de fibras extrínsecas (AEFC). PD: pre-dentina (tomado de Bosshardt y Selvig, 1997).



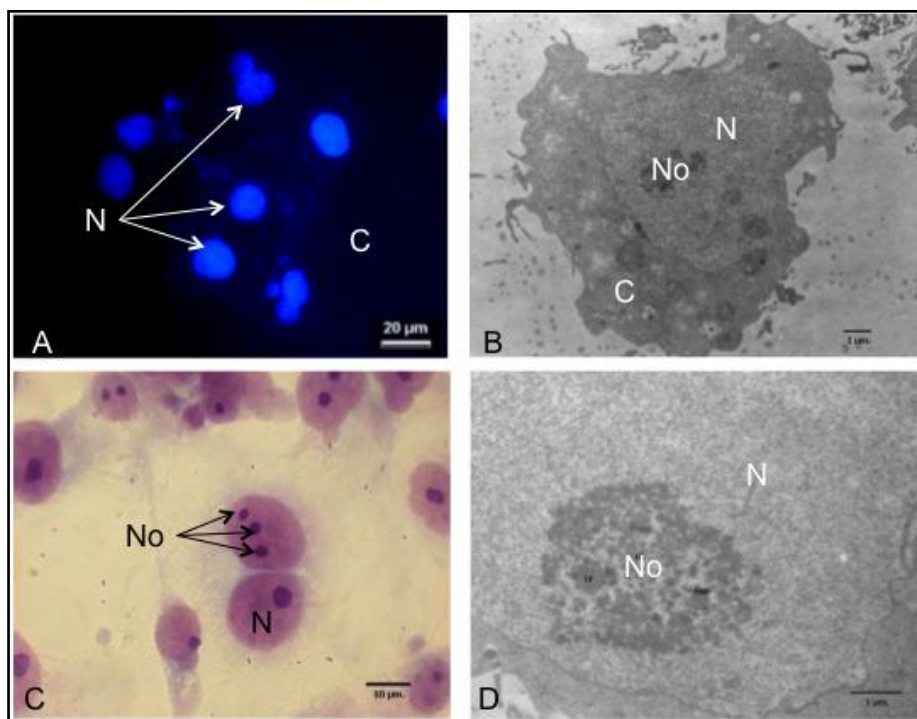


Figura 2. Cementoblastos en cultivo.

A) Núcleo de cementoblastos teñido con DAPI. B) Ultraestructura de un cementoblasto por Mic. Electrónica de Transmisión. Obsérvese el citoplasma, el núcleo y el nucléolo. C) Nucleólos de cementoblastos teñido con Azul de Toloudina para RNA. D) Ultraestructura del nucleólo por MET. N: Núcleo, No: nucleolo, C: citoplasma. (Cortesía Dra. Ivet Gil).

**4) Cemento Mixto Celular Estratificado (CMSC).**- es posible encontrarlo en las bifurcaciones (después de la erupción) y en el tercio apical de las raíces, en donde tiene función adaptativa y remodeladora de la superficie radicular ante los movimientos del diente en el alveolo (Schroeder, 1988; Yamamoto *et al*, 1997). El CMSC se forma por el depósito alternado de capas de AEFC, AIFC y CIFC conocidas como “líneas incrementales” o “líneas de descanso” (Schroeder, 1988).

En términos generales, si comparamos los distintos tipos de cemento, podemos concluir que el AEFC es el más mineralizado de todos, pues carece de células y lacunaes; además, de que, su formación es un proceso lento que le permite permanecer en contacto directo y por más tiempo con los fluidos de los tejidos (Bosshardt y Selvig, 1997).

#### 4.1.4. Composición Bioquímica del Cemento

La mineralización no uniforme del cemento se debe a diferencias en la cantidad de sus constituyentes bioquímicos, lo que resulta en los distintos tipos de cemento. El cemento, al igual que la dentina y el hueso, contiene moléculas bioactivas que promueven la migración, adhesión, y crecimiento de los fibroblastos e influyen en la síntesis de la matriz extracelular (ME) (Somerman *et al*, 1991; Nakae *et al*, 1991; Arzate *et al*, 1992a; Gehron, 1996). Cabe mencionar que, algunas moléculas presentes en el cemento existen en mayor o menor cantidad o bien, están ausentes del todo en otros tejidos mineralizados, o en los tejidos conectivos (McAllister *et al*, 1990; Somerman *et al*, 1991; Nakae *et al*, 1991). El cemento carece de irrigación (al menos de forma directa), drenaje linfático e inervación (Nakae *et al*, 1991; Arzate *et al*, 1992a), tiene un metabolismo lento y sigue un proceso de diferenciación (mineralización) distinto al de otros tejidos mineralizados (Arzate *et al*, 1998). Además, está constituido por agua, por una matriz orgánica y una matriz inorgánica distribuidos en partes iguales. El 50% de la masa seca es inorgánica y corresponde a cristales de hidroxiapatita (HA), mientras que el 50% restante corresponde a la matriz orgánica y contiene glicoproteínas, proteoglucanos y principalmente fibras de colágena (Bosshardt y Selvig, 1997).

##### I. Matriz Inorgánica.

La hidroxiapatita (HA)  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  ocupa el 50% del material inorgánico del cemento (Bartold y Narayanan, 2006).

##### II. Matriz Orgánica.

- 1) Fibras colágenas.- las principales fibras de colágena son I y III. La primera constituye el 90% de toda la matriz orgánica, provee el andamio y regula la forma de los cristales de hidroxiapatita; la segunda constituye el 5% y cubre las fibras de colágena I (Nanci y Bosshardt, 2006).

## 2) Proteínas no Colágenas

a) Glucoproteínas. Al igual que en el hueso, las proteínas no colagénicas incluyen sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN) (Somerman *et al*, 1991), osteocalcina (OCN) (Thomas, 1995) y osteonectina (Bosshardt y Selvig 1997). BSP y OPN participan en la migración y diferenciación de células pre-cementoblásticas a partir de una población heterogénea (Grzesik y Narayanan, 2002).

b) Proteoglucanos.

Los proteoglucanos encontrados en cemento, aunque no específicos de éste, son decorina, biglicano, versicano (Bartold y Narayanan, 2006), lumicano, fibroglucano, y fibromodulina (Olson *et al*, 1991). Hasta el momento, se desconoce el papel de los proteoglucanos en la enfermedad periodontal y en la formación de cemento durante la reparación periodontal (Bartold *et al*, 1990; Bartold y Narayanan, 2006).

c) Proteínas del esmalte

Rara vez están presentes en cemento, y cuando lo hacen su expresión es inconsistente tanto en tipo como en lugar, es decir, no todas las proteínas se expresan, algunas veces se localizan en el área cervical, otras en el área apical, y únicamente en etapas tempranas del desarrollo radicular (Bosshardt y Nanci, 2004; Swanson *et al*, 2006).

d) Fosfatasa alcalina

Es una enzima que participa en la mineralización del cemento, su actividad se correlaciona positivamente con el grosor del mismo (Bosshardt y Selvig, 1997; Van den Bos y Beertsen, 1999).

e) Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento del cemento son BMP2, BMP3, BMP4, BMP7, PDGF, aFGF, bFGF, TGF- $\beta$  e IGF-I (Nakae *et al*, 1991; Popowics *et al*, 2005).

f) Proteínas específicas del cemento

A diferencia de las moléculas mencionadas arriba, que son compartidas por cemento, hueso, dentina y ligamento periodontal, a la fecha existen tres proteínas aparentemente específicas de cemento: Factor de Crecimiento del Cemento (CGF), Proteína del Cemento 1 (CEMP1) y Proteína de Adhesión del Cemento Radicular (CAP).

CGF es el principal factor mitogénico del cemento humano y bovino (Nakae *et al*, 1991; Narayanan y Yonemura, 1993; Pitaru *et al*. 1993).

CEMP-1 es una proteína que participa en la diferenciación de los cementoblastos y promueve la mineralización de la matriz cementoide (Alvarez-Pérez *et al*, 2006) y de células no osteogénicas (Carmona-Rodríguez *et al*, 2007) a través de la nucleación de cristales de fosfato octacálcico, lo que la convierte en una candidata importante para la regeneración de cemento y/o hueso (Villarreal-Ramírez *et al*, 2009; Romo-Arévalo *et al*, 2009).

Las características de la proteína de adhesión del cemento se describen en el capítulo denominado CAP.

#### **4.1.5. Destrucción del cemento**

La destrucción y pérdida del cemento es el resultado de la periodontitis, la cual se describe como una enfermedad inflamatoria irreversible de los tejidos de soporte del periodonto (Chano *et al*, 2003) que resulta de la susceptibilidad o resistencia del huésped a bacterias patógenas y que está determinada por factores genéticos, adquiridos y ambientales (Van Dyke y Dave, 2005; Nibali *et al*, 2009).

A nivel local, el desarrollo de la periodontitis inicia con el depósito de endotoxinas bacterianas que invaden el epitelio de unión, se diseminan hacia el tejido conectivo y ocasionan destrucción de cemento y hueso alveolar, lo que resulta en la formación de un epitelio largo de unión, una bolsa gingival y exfoliación dental (Yonemura *et al*, 1992; Nanci y Bosshardt, 2006). Las superficies de cemento contaminadas con bacterias experimentan cambios morfológicos y químicos que contribuyen significativamente al progreso de las lesiones. Puesto que, las endotoxinas unidas a raíces inhiben la adhesión celular *in vitro*, es posible que las superficies de cemento

contaminadas bloqueen la adhesión de nuevas fibras de colágena a las superficies expuestas de la raíz y se conviertan en un obstáculo importante para la cicatrización de los tejidos periodontales (Chano, 2003). Esta cicatrización es un proceso que requiere la interacción de moléculas de la matriz extracelular con células en un tiempo, orden y cantidad específicos; el resultado de esta interacción determinará si la cicatrización ocurre como reparación o regeneración (Grzesik y Narayanan, 2002).

La reparación periodontal es el resultado del empleo de terapias periodontales simples como el raspado y el alisado radicular (Yang *et al*, 2009), así como de terapias un poco más elaboradas que incluyen el empleo de biomateriales, moléculas bioactivas, ingeniería de tejidos, y la terapia génica y celular (McCulloch *et al*, 1993; JADA, 2002; Jin *et al*, 2003; Zhao *et al*, 2004; Taba *et al*, 2005; Hakki *et al*, 2005; Bosshardt *et al*, 2005; Lin *et al*, 2008). Estas terapias logran cierta ganancia en el nivel de unión y radiográfica e histológicamente, limitadas mejorías (Yang *et al*, 2009) porque producen un largo epitelio de unión (McCulloch, 1993; Bosshardt *et al*, 2005) en lugar de hueso (Lin *et al*, 2008) y cemento nuevos (Yang *et al*, 2009). El epitelio de unión es el elemento característico de la reparación periodontal, y el resultado de la incapacidad de las superficies enfermas de la raíz para promover el crecimiento y adhesión de los fibroblastos que, de lo contrario permitirían la formación de tejido conectivo (Saito y Narayanan, 1999).

Por otro lado, la regeneración periodontal está basada en recapitular el microambiente durante la formación original del cemento, hueso, y ligamento periodontal; a través del reclutamiento, la proliferación, y diferenciación de células específicas, a fin de formar nuevos tejidos periodontales, y finalmente, reestablecer la unión entre el tejido conectivo y las superficies dentales (MacNeil y Thomas, 1993b; Saito y Narayan, 1999).

## 4.2. Gen CAP/PTPLA

La familia de genes identificada como Proteínas Tirocinas parecidas a las Fosfatasas (PTPL por sus siglas en inglés), posee el típico sitio activo de la familia de las Proteínas Tirocinas Fosfatasas (PTPasas), con la diferencia que una prolina reemplaza a la altamente conservada arginina, (I/V)HCXXGXXPS. La familia de las PTPLs está conformada por lo menos de tres miembros, los cuales fuera del sitio catalítico no comparten secuencias homólogas con alguna otra familia de las PTPasas (Fig. 3).

PTPLA, uno de los tres miembros de la familia de las PTPL, es una proteína donde la substitución de arginina por prolina podría inactivarla; de ahí que, pueda carecer de actividad fosfatasa o tener una actividad anti-fosfatasa y por lo tanto, representar una clase distinta de PTPasas (Uwanogho *et al*, 1999).

```

1 ggactttattcaaacctgtgccaatgtgaggoggaggagggtctcactctccaataggcatcaaggacagagttaagg 80
81 atgttttggggacaaagaagacactgcccttgagggt ATG GGG AAA GGT GAT TGG AGG CAG GGC AGA GTA 149
1 M G K G D W R Q G R V 11
150 GAG ATG CCT TGT GCA CAC GTG AGC AGA CTT CAT AAG ACA TGC GTA CAG GTC CGC GTG CGC 209
12 E M P C A H V S R L H K T C V Q V R V R 31
210 GTC ACC ATG GCG TCC AGT GAG GAG GAC GGC ACC AAC GGC GCC TCC GAG GCC AGC GAC GAG 269
32 V T M A S S E E D G T N G A S E A S (D) E 51
270 AAG GAA GCC GCC GGC AAG CGG AGA CGC CTA GGC TTA CTG GCC ACC GCC TGG CTC ACC TTC 329
52 K E A A G K R R R L G L L A T A W L T F 71
330 TAC AAT ATC GCC ATG ACG GCC GGG TGG TTG GTT CTT GCT ATT GCT ATG GTA CGC TTT TAT 389
72 Y N I A M T A G W L V L A I A M V R F Y 91
390 ATG GAA AAA GGA ACA CAC AGA GGT TTA TAT AAA AGC ATT CAG AAG ACA CTT AAG TTT TTC 449
92 M E K G T H R G L Y K S I Q K T L K F F 111
450 CAA ACA TTT GCT TTG CTT GAG GTA GTC CAT TGT CTG ATC GGA ATT GTA CCC ACT TCT GTG 509
112 Q T F A L L E V V H C L I G I V P T S V 131
510 CTT GTG ACT GGG GTC CAA GTG AGC TCA AGA ATC TTC ATG GTG TGG CTC ATT ACT CAC AGT 569
132 L V T G V Q V S S R I F M V W L I T H S 151
570 ATA AAA CCC ATC CAG AAT GAA GAG AGC GTG GTG CTT TTT CTG GTC TCC TGG ACT GTG ACC 629
152 I K P I Q N E E S V V L F L V S W T V T 171
630 GAG ATC ACT CGC TAT TCC TTC TAC ACA TTC AGT CTC CTC GAC CAC TTG CCG CAC TTC ATT 689
172 E I T R Y S F Y T F S L L D H L P H F I 191
690 AAA TGG GCC AGA TAC AAT TTG TTT ATC ATC TTA TAT CCC GTT GGA GTT GCT GGG GAA CTT 749
192 K W A R Y N L F I I L Y P V G V A G E L 211
750 CTC ACA ATA TAC GCC GCC TTG CCT TAC GTA AAG AAG TCA GGA ATG TTC TCA GTA CGG CTT 809
212 L T I Y A A L P Y V K K S G M F S V R L 231
810 CCC AAC AAG TAC AAT GTT TCT TTT GAC TAC TAC TAT TTT CTT CTC ATA ACC ATG GCC TCC 869
232 P N K Y N V S F D Y Y Y F L L I T M A S 251
870 TAT ATA CCG TTG TTT CCT CAG CTC TAT TTT CAT ATG TTA CGT CAG AGA AGA AAG GTG CTC 929
252 Y I P L F P Q L Y F H M L R Q R R K V L 271
930 CAC GGG GAG GTG ATC GCG GAG AAG GAC GAT TAA gtgggtcccacacacaagggtgctcttttcagaaaaa 998
272 H G E V I A E K D D * 282
999 ccggattacttgagtccaagttttaataataagaataaacgacttcatgaaataccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1078
1079 aa 1080

```

Figura 3. Secuencia de nucleótidos y de amino ácidos de PTPLA.

El sitio activo de la proteína tirosina fosfatasa está encuadrado, el residuo aspártico conservado está marcado con círculo y la señal de localización nuclear está subrayada. La secuencia PolyA se indica con negrita (GenBank AF11943), (tomado de Uwanogho *et al*, 1999).

El gen de *PTPLA* es sinónimo de *CAP*, por lo que, de ahora en adelante nos referiremos a él como *CAP/PTPLA*. En el humano, este gen se localiza en el cromosoma 10p13-p14 y tiene 6 exones. El gen codifica para dos isoformas de 288 y 140 aminoácidos, respectivamente (Uwanogho *et al*, 1999).

El ARN mensajero que codifica para la proteína de 140 aminoácidos se denomina *CAP/PTPLA* (número de acceso GenBank AY455942), y contiene los exones 1 y 3 de los seis del gen *CAP/PTPLA*. El ADNc está conformado de 1435 pares de bases escritas a continuación:

|  |            |
|--|------------|
| gagagctggc tgcgcccgagc cccctgcccgc ctgcac                          | 36         |
| <b>ATG GGG CGC CTG ACG GAA GCG GCG GCA GCG GGC AGC GGC TCT CGG</b> | <b>81</b>  |
| M G R L T E A A A A G S G S R                                      | 15         |
| <b>GCT GCA GGC TGG GCA GGG TCC CCT CCC ACG CTC CTG CCG CTG TCT</b> | <b>126</b> |
| A A G W A G S P P T L L P L S                                      | 30         |
| <b>CCC ACG TCC CCC AGG TGC GCG GCC ACC ATG GCG TCC AGC GAC GAG</b> | <b>171</b> |
| P T S P R C A A T M A S S D E                                      | 45         |
| <b>GAC GGC ACC AAC GGC GGC GCC TCG GAG GCC GGC GAG GAC CGG GAG</b> | <b>216</b> |
| D G T N G G A S E A G E D R E                                      | 60         |
| <b>GCT CCC GGC GAG CGG AGG CGC CTG GGG GTC TTG GCC ACC GCC TGG</b> | <b>261</b> |
| A P G E R R R L G V L A T A W                                      | 75         |
| <b>CTC ACC TTC TAC GAC ATC GCC ATG ACC GCG GGG TGG TTG GTT CTA</b> | <b>306</b> |
| L T F Y D I A M T A G W L V L                                      | 90         |
| <b>GCT ATT GCC ATG GTA CGT TTT TAT ATG GAA AAA GGA ACA CAC AGA</b> | <b>351</b> |
| A I A M V R F Y M E K G T H R                                      | 105        |
| <b>GGT TTA TAT AAA AGT ATT CAG AAG ACA CTT AAA TTT TTC CAG ACA</b> | <b>396</b> |
| G L Y K S I Q K T L K F F Q T                                      | 120        |
| <b>TTT GCC TTG CTT GAG GTA AGT TTT CCA TCA TGC TGT TTT TCT ATT</b> | <b>441</b> |
| F A L L E V S F P S C C F S I                                      | 135        |
| <b>GCT GTA ATA TTT ATG TGA</b> a cattttttgt tgtgcaaaat             | <b>480</b> |
| <b>A V I F M *</b>   | 140        |
| caatatgatt ttgctgatta cataccacct atggatttgc tgaatgccaa tgttgacagt  | 540        |
| ggtttattta atgttttcta ttattgacgt aatgattttt ttctatttgc ttacagatag  | 600        |
| ttcactgttt aattgggtgag tttttgcttc aattttatac ttttattata aattgccttt | 660        |
| agggcaatag ttcaactgtt tttcttttta aggaattgta cctacttctg tgattgtgac  | 720        |
| tggggctccaa gtgagttcaa gaatctttat ggtgtggctc attactcaca gtataaaacc | 780        |
| agtaagtgac acaaacatgt tgtctacttg agcctgcagg aaagctttcc attcatagga  | 840        |
| atctaaaata ttaacatttg tatatttcag gaggtggaag tgttgacaa aaaggagtgtg  | 900        |
| ggtttgagtt ttagatgttg tgcattgact tagtgcctta gcagaatgac tttgatacac  | 960        |
| aaacaaaccc aaatattggc atcttagatc cgtaatatat tctcctttga tattttccag  | 1020       |
| tttttgaaat cagtattcag gttctgtcaa ataacctgca gaaaatgttc ttttctatag  | 1080       |
| aagtttcttt tcaatccaag ttgtcctott tgattatgta atcgaagttg tcagtataca  | 1140       |
| atattattatt tctggccagc cgcagtgagg cacacctgta atcccagcac tttgggaggc | 1200       |
| caaggcgggt ggatcacctg aggtcaggag tttgagacca gcctggccaa catggtgaaa  | 1260       |
| ccctgttccct actaaaaata caaaaattaa ccaggcgtgg gggcgagcac ctggaatccc | 1320       |
| agctactcag gaggccgagg cagaagaatc gcttgaaccc gagaggcaaa ggttgacattg | 1380       |
| agctgagatt gtgccactgc actccagcct gggcgacaga gcgagactcc gtctg       | 1435       |

Figura 4. ARN mensajero *CAP/PTPLA*.

La secuencia codifica para una proteína de 140 aminoácidos denominada *CAP/PTPLA* (GenBank AY455942). Esta isoforma (número dos) se caracteriza por tener 15 aminoácidos no encontrados en la isoforma uno, también llamada *PTPLA*.



Los nucleótidos en negrita (37-456) codifican para la proteína CAP/PTPLA y las letras marcadas con rojo se refieren a los últimos 15 aminoácidos, los cuales al no ser compartidos por otra secuencia, hacen única esta región de la proteína.

#### Identificación del ARNm de CAP/PTPLA en Humanos

El gen *CAP/PTPLA* se expresa preferentemente en corazón de feto y de adulto, y a un nivel más bajo en tejido esquelético y en músculo liso. La expresión temprana de este gen y su persistencia en tejidos del adulto sugieren que tiene un papel en el desarrollo, diferenciación y mantenimiento de diferentes tejidos (Uwanogho *et al*, 1999).

#### **4.2.1. Proteína CAP/PTPLA**

Los 140 aminoácidos de la proteína CAP/PTPLA le confieren un peso molecular de 14.920 kDa. Los análisis *in Silico* de CAP/PTPLA indican que su carga eléctrica es neutra (pI 7.78) debido al número similar de aminoácidos positivos (Arg, Lys) y negativos (Asp, Glu). Asimismo, refieren que es una proteína hidrofóbica por la presencia de dichos aminoácidos en las zonas 70-98 y 118-137; y que su localización es citoplasmática en un 94.19% debido a la carencia de péptido señal.

También, estos análisis sugieren la existencia de modificaciones postraduccionales, particularmente, fosforilaciones en serinas 12, 30, 33, 43, 53; y en treoninas 5, 103. Finalmente, la estructura secundaria de la proteína presenta  $\alpha$ -hélices en los aminoácidos 5-15, 39-42, 58-102, 115-126 y 133-139, y conformaciones  $\beta$  en las posiciones 15-37, 43-64, 102-115 y 128-132.

Cabe mencionar que, el splicing alternativo de la proteína CAP/PTPLA ocurre en el sitio activo (subrayado) de la proteína PTPLA (288 aminoácidos). Los últimos quince aminoácidos de CAP/PTPLA se indican en negrita y son específicos para esta proteína. En la Figura 4 se muestra una comparación de ambas proteínas.

|            |                    |                   |            |            |            |            |
|------------|--------------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|
|            | 10                 | 20                | 30         | 40         | 50         | 60         |
| <b>CAP</b> | MGRLTEAAAA         | GSGSRAAGWA        | GSPPTLLPLS | PTSPRCAATM | ASSDEDGTNG | GASEAGEDRE |
|            | .....              | .....             | .....      | .....      | .....      | .....      |
| PTPLA      | MGRLTEAAAA         | GSGSRAAGWA        | GSPPTLLPLS | PTSPRCAATM | ASSDEDGTNG | GASEAGEDRE |
|            | 10                 | 20                | 30         | 40         | 50         | 60         |
|            | 70                 | 80                | 90         | 100        | 110        | 120        |
| <b>CAP</b> | APGERRRLGV         | LATAWLTFYD        | IAMTAGWLVL | AIAMVRFYME | KGTHRGLYKS | IQKTLKFFQT |
|            | ::: ::::           | .....             | .....      | .....      | .....      | .....      |
| PTPLA      | APGERRRLGV         | LATAWLTFYD        | IAMTAGWLVL | AIAMVRFYME | KGTHRGLYKS | IQKTLKFFQT |
|            | 70                 | 80                | 90         | 100        | 110        | 120        |
|            | 130                | 140               | 150        | 160        | 170        | 180        |
| CAP        | FALLE <b>VSFPS</b> | <b>CCFSIAVIFM</b> |            |            |            |            |
|            | :::::              |                   |            |            |            |            |
| PTPLA      | <u>FALLEIVHCL</u>  | <u>IGIVPTSVIV</u> | TGVQVSSRIF | MVWLITHSIK | PIQNEESVVL | FLVAWTVTEI |
|            | 190                | 200               | 210        | 220        | 230        | 240        |
| PTPLA      | TRYSFYTFSL         | LDHLPYFIKW        | ARYNFFIILY | PVGVAGELLT | IYAALPHVKK | TGMFSIRLPN |
|            | 250                | 260               | 270        | 280        |            |            |
| PTPLA      | KYNVSFDYYY         | FLLITMASYI        | PLFPQLYFHM | LRQRRKVLHG | EVIVEKDD   |            |

Figura 5. Secuencia de aminoácidos de las isoformas CAP/PTPLA y PTPLA del gen PTPLA. Las proteínas CAP/PTPLA y PTPLA cuentan con 140 y 288 aminoácidos, respectivamente. Las letras en negrita indican los últimos quince aminoácidos de la proteína CAP/PTPLA que están ausentes en PTPLA y las letras subrayadas indican el sitio activo de la proteína PTPLA.

#### 4.2.2. Localización espacial de CAP/PTPLA

La proteína CAP ha sido aislada de cemento humano y bovino (McAllister *et al.* 1990; Arzate *et al.*, 1992b).

Anticuerpos monoclonales contra CAP de bovino (H166) incubados con tejidos humanos reconocen cemento (AEFC, CIFC) y matriz cementoide, pero no dentina, gíngiva, o ligamento periodontal. El hueso alveolar tampoco fue reconocido por los anticuerpos, excepto por algunas células paravasculares (Arzate *et al.*, 1992a). De la misma forma, anticuerpos monoclonales contra CAP bovina (3G9) reconoció cementoblastos y cemento en cortes de adulto y en gérmenes dentarios de bovino (Saito *et al.*, 2001). Mientras que en células del folículo dental transplantadas a ratón, 3G9 reconoce un tejido parecido al cemento (Handa *et al.*, 2002). 3G9 se considera un anticuerpo específico contra CAP puesto que no detecta ningún tipo de colágena

(III, V) (Saito *et al*, 2001). CAP también ha sido identificada en células derivadas de tumores humanos (las cuales la sintetizan, la expresan en su superficie y la secretan) (Arzate *et al*, 1992b; Arzate *et al*, 1998) y en células del ligamento periodontal (Barkana *et al*, 1998).

#### **4.2.3. Funciones de CAP**

##### **1. Adhesión y Eventos de Señalización**

CAP (bovina) promueve la adhesión de fibroblastos gingivales (FG), probablemente, a través de una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) y del receptor de integrina  $\alpha 5\beta 1$  localizado en la superficie de las células (Saito y Narayanan, 1999; Komaki *et al*, 2000). En el caso de fibroblastos gingivales humanos, la adhesión de estas células a CAP es necesaria para la fosforilación de tirosinas de ERK2 (un componente de la cascada de MAPK) y la expresión de *c-fos* (Saito y Narayanan, 1999; Komaki *et al*, 2000). La fosforilación de ERK2 sólo es necesaria para la expansión de FG, mientras que proteínas tirosina cinasas de la cascada de MAPK por arriba de ERKs, son necesarias para la adhesión, expansión y proliferación celular (Komaki *et al*, 2000).

##### **2. Migración**

Varios estudios han demostrado el efecto quimiotáctico y selectivo de CAP en células periodontales (Metzger *et al*, 1998; Trujillo y Arzate, 2002).

##### *CAP de bovino, raíces porcinas y tejidos humanos*

Estudios *in vitro* muestran que, CAP de bovino promueve de manera dosis-dependiente y selectivamente la migración y la adhesión de poblaciones celulares derivadas de tejidos periodontales humanos hacia raíces porcinas tratadas con CAP. Entre estas células las del hueso alveolar responden mejor que las del ligamento periodontal, y éstas a su vez, mejor que las derivadas de encía. CAP no tiene efecto alguno en células epiteliales (Pitaru *et al*, 1993). De la misma forma, experimentos en cámaras quimiotácticas muestran la preferencia de CAP por células del ligamento periodontal mas que por las células FG (Metzger *et al*, 1998). CAP aislada de

gérmenes dentarios de bovino es capaz de atraer selectivamente células a partir de una población heterogénea de células del folículo dental (Saito *et al*, 2001).

#### *CAP de bovino, raíces humanas y tejidos humanos*

Células del ligamento periodontal se han incubado con raíces humanas tratadas con CAP y se ha observado que la proteína presenta actividad quimiotáctica para células putativas cementoblásticas a partir de una población heterogénea del ligamento periodontal (Barkana *et al*, 2000).

### **3. Mineralización**

Muchos han sido los estudios para comprobar el origen de las células progenitoras de cementoblastos y su capacidad mineralizante; entre ellos destacan la identificación de progenitores de cementoblastos en células del folículo dental bovino (Handa *et al*, 2002) con capacidades mineralizantes; así como, la presencia de CAP en células del hueso alveolar humano (Arzate *et al*, 1998). Puesto que los procedimientos para disecar el cemento son laboriosos y el metabolismo del mismo es muy lento, el aislamiento de células putativas cementoblásticas de un cementoblastoma humano ha permitido tener material suficiente para estudiar el patrón de mineralización y la composición protéica del cemento (Arzate *et al*, 1998). Las células derivadas del cementoblastoma se organizan en masas mineralizadas tipo cemento, en forma esférica o irregular, y cuya composición química se ha identificado como HA. Esta línea celular se considera una población de células homogéneas putativas cementoblásticas porque CAP se identificó en las células alrededor de las masas mineralizadas, en los cementocitos y en la matriz. Los resultados anteriores permitieron establecer las características del fenotipo cementoblástico que fue confirmado posteriormente por clones del ligamento periodontal humano (cuyos progenitores fueron incubados previamente con CAP de bovino), los cuales al mineralizar mostraron pequeñas estructuras nodulares mineralizadas. Estas clonas mostraron una relación directa entre su capacidad de unión a CAP y su capacidad para mineralizar y expresar CAP, BSP y ALP (los dos últimos son marcadores de mineralización), por lo que se considera que, la capacidad de una clona para unirse a CAP es un indicador de la tendencia del

mismo a formar parte de la línea celular que constituye el cemento, o bien que, CAP es capaz de aumentar la diferenciación de los progenitores de cementoblastos (Barkana *et al*, 2000). CAP (de bovino) se une específicamente a dentina mineralizada, a HA sintética, a fibronectina, y al complejo fibronectina-colágena, pero no a la dentina desmineralizada (Pitaru *et al*, 1993).

En resumen, el hecho de que CAP es aislada únicamente de la matriz de cemento (Arzate *et al*, 1992a) localizada en cementoblastos (Saito *et al*, 2001) y en cemento (Arzate *et al*, 1992a; Pitaru *et al*, 1993), y producida por líneas celulares derivadas de tumores de cemento (Arzate *et al*, 1992b, 1998), sugiere que CAP está fuertemente asociada con el fenotipo cementoblástico (Pitaru *et al*, 1993; Barkana *et al*, 2000; Saito *et al*, 2001). En otras palabras, esta proteína no solamente promueve la adhesión selectiva de células osteoblásticas, sino también entre las células del ligamento periodontal, aquellas que se unen fuertemente a CAP son capaces de formar, *in vitro*, un tejido mineralizado parecido al cemento (Liu *et al*, 1997).

#### **4.3. Proteína Recombinante**

Las proteínas recombinantes, también llamadas proteínas fusión, son el producto de genes cuyas secuencias de DNA son distintas. Para su fabricación, dos o más segmentos de DNA se introducen en un vector de expresión, el cual contiene una secuencia para una marca artificial. Así, cuando el DNA sea transcrito las secuencias se fusionarán y una vez traducido la proteína resultante tendrá características de varias secuencias de DNA, además de una marca que le permita ser aislada a través de una columna de purificación (Strachan y Read, 2004).

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a la Secretaría de Salud de México el 67% de los pacientes que asisten a los servicios de salud cursan alguna enfermedad de las encías, lo que es el prefacio de serias repercusiones en la salud y en la calidad de vida (México Sano, 2008). Las terapias periodontales actuales (biomateriales, moléculas bioactivas, terapia celular y genética) logran cierta ganancia en la formación de los tejidos periodontales pero no restauran por completo la arquitectura y la función original de los mismos; en otras palabras, logran la reparación mas no la regeneración periodontal.

El cemento radicular, considerado un tejido clave para la inserción de las fibras del ligamento periodontal en la raíz dental, contiene varios factores que regulan la migración, la adhesión, el crecimiento y la síntesis de fibroblastos. Estos factores, son importantes para la formación y regeneración de los tejidos conectivos periodontales, por lo que, su destrucción durante la periodontitis (por exposición a los contenidos de la bolsa periodontal) podría ser la razón por la cual los intentos para inducir anclajes nuevos de las fibras del ligamento periodontal en las superficies radiculares tanto enfermas como desmineralizadas no tengan éxito. De hecho, la formación de nueva inserción es el mayor reto en la terapéutica periodontal.

En este sentido, el uso de proteínas del cemento, al ser factores locales y constituyentes normales de las raíces, parece ser una mejor opción para la regeneración periodontal. Desafortunadamente, la cementogénesis es un proceso comprendido limitadamente, porque la información sobre sus mecanismos celulares y moleculares es poca, el origen de los cementoblastos es incierto, y las proteínas del cemento son compartidas por ligamento periodontal hueso y dentina.

De ahí que, una proteína que participe en la cementogénesis (reclutando células apropiadas a las áreas enfermas, promoviendo la mineralización y formación de

tejidos conectivos) y que se considere un marcador específico de cemento pueda generar resultados positivos al emplearse como terapia periodontal en la clínica.

Por lo tanto, este estudio propone una caracterización adicional de la proteína CAP/PTPLA, conocida por promover selectivamente la migración, adhesión y mineralización de células periodontales, con la finalidad de determinar si es propia de tejidos periodontales, certificarla como marcador específico de cemento y finalmente, entender su función en la cementogénesis.

## 6. HIPÓTESIS.

El empleo de la proteína recombinante CAP/PTPLA permitirá determinar si la molécula está asociada al cemento radicular y es un marcador biológico.

## 7. OBJETIVOS

### General.

Expresar y caracterizar la proteína recombinante CAP/PTPLA y determinar su expresión en estructuras periodontales y no periodontales humanas.

### Específicos.

#### I. Caracterizar la proteína hrCAP/PTPLA

- a. Clonación y expresión de CAP/PTPLA en un modelo Procarionte.
- b. Purificación de CAP/PTPLA recombinante (hrCAP/PTPLA).

#### II. Producir anticuerpos policlonales contra la proteína hrCAP/PTPLA

#### III. Determinar la localización de la proteína CAP/PTPLA

- a. Líneas celulares periodontales humanas (Inmunocitoquímica e Inmunotrasferencia: anti-hrCAP/PTPLA).
- b. Tejidos periodontales humanos (Inmunohistoquímica: anti-hrCAP/PTPLA).
- c. Tejidos no periodontales humanos (anti-hrCAP/PTPLA).

#### IV. Identificar el ARNm de CAP/PTPLA

- a. Líneas celulares periodontales humanas (QTRT-PCR).
- b. Tejidos periodontales humanos (Hibridación *in situ*).



## 8. MATERIALES Y METODOS

### **Construcción del ADNc en plásmido de expresión bacterial**

El ADNc que codifica para la proteína CAP se clonó en un vector de entrada pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) para garantizar su direccionalidad en marco de lectura. Para lograr dicha direccionalidad en el vector de entrada los oligos se diseñaron como sigue: el oligo sentido se diseñó añadiendo 4 pares de bases (CACC) en el extremo 5' seguido por un codón de inicio (ATG) a fin de lograr un espacio adecuado para el inicio de la traducción y una correcta direccionalidad de clonación (5' CACC ATG GGC ACA TCA AGC ACT GA 3'). El oligo antisentido se diseñó eliminando el codón de paro nativo a fin de fusionar el producto de PCR, alineado con el carboxilo terminal del vector de entrada, con la secuencia que codifica para los epítopes de V5 y 6xHis en la región carboxilo terminal del vector destino Gateway pET-DEST 42 (Invitrogen, Carlsbad, CA), e inducir la expresión (5' CCC CAT TAG TGT CAT CCT GC 3'). El clon resultante pDEST42/hrCAP/PTPLA se introdujo en células competentes *E.coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### **Clonación y expresión de la proteína humana recombinante CAP/PTPLA (hrCAP/PTPLA)**

Para la expresión de la proteína recombinante, las células BL21(DE3)pLysS/pDEST42/hrCAP/PTPLA se crecieron a 37°C en medio de cultivo LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina y 34 µg/ml de cloranfenicol hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 600 nm. A partir de este momento se adicionó Isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 1.0 mM para inducir la expresión de la proteína hrCAP/PTPLA. El cultivo se incubó por 12 horas a 37°C en condiciones de 100% humedad y aisladas de la luz, ya que el gen *CAP/PTPLA* está bajo el control del promotor *T7lac*, del bacteriófago T7, que es inducible por IPTG. Al término del período de inducción las células de *E.coli* se centrifugaron a 8617g a 4°C por 15 minutos. El botón celular fue resuspendido en amortiguador de ruptura (4 mL de ruptura por cada 100 mL de medio LB) y sonificado durante cinco

ciclos de un minuto con intervalos de un minuto entre cada uno. Una vez sonicado, se le adicionó lisozima a una concentración final de 1 mg/mL, DNAsa y RNAsa a una concentración final de 5 ug/mL cada una, inhibidores de proteasas (PMSF, N-etilmaleimida, aprotinina 1 ug/mL, leupeptina y pepstatina 0.5 ug/mL) y se incubó a 4°C con agitación durante 1 hora. El sobrenadante se recuperó a través de dos ciclos de centrifugación, el primero de 9805 g durante 15 min., y el segundo a 159,800 g, ambos a 4°C.

### **Purificación de la proteína hrCAP/PTPLA**

El extracto celular obtenido se precipitó con sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 20, 40, 60 y 80% de saturación. La sal de sulfato se agregó lentamente a la muestra, la cual estaba en agitación suave a 4°C. La muestra se incubó durante 2 horas y posteriormente, se centrifugó a 193,400 g durante 22 min., el precipitado se almacenó a -20°C y al sobrenadante se le agregó el siguiente porcentaje de saturación y se repitió el proceso. La fracción de 20% fue desechada, y las fracciones de 40%, 60% y 80% se juntaron y dializaron con membrana de punto de corte de 12-14 kDa (Spectra/Por VWR Scientific), contra 50 volúmenes de PBS (buffer fosfato salino) 1x pH7.4 con dos cambios de PBS cada 24 hrs.

Posteriormente, la muestra se purificó a través de cromatografía de afinidad en una columna de  $\text{Ni}^{2+}$  HisPrep FF 16/10 (20mL) (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ). La columna se equilibró con PBS 1x pH 7.4 sin imidazol, y después se lavó con varias concentraciones de Imidazol (30, 50, 100, 200, 500 mM). Las fracciones conteniendo la proteína hrCAP/PTPLA (30, 50 y 100 mM) se recolectaron en un concentrador Amicon (Ultra-15, PLGC Ultracel-PL Membrane, 10 kDa) y se dializaron contra 50 volúmenes de una solución de fosfato de sodio 10 mM pH7.2 durante toda la noche a 4°C. La última purificación se llevó a cabo en una columna HA Ultrigel (10 mL), misma que se equilibró con fosfato 20 mM pH 7.2 y los golpes de elución fueron de 50, 100, 200 y 500 mM. Todas las purificaciones se analizaron en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12% y se tiñeron con Azul de Coomassie. La fracción obtenida de la columna HA Ultrigel se concentró y se utilizó tanto para la inmunotransferencia (donde se detectaron los epítopes de histidina y de CAP/PTPLA), como para la producción de anticuerpos

policlonales. El marcador usado en los geles de poliacrilamida fue Novex®Sharp Pre-stained (Invitrogen).

### **Electroforesis de la proteína humana recombinante CAP/PTPLA en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Para identificar la proteína hrCAP se utilizaron geles SDS-PAGE al 12% y se corrieron a 100V por 45 min. En cada carril se cargaron 10µg/mL de proteína. Los geles se tiñeron con solución de Azul de Coomassie para observar la especie de proteína hrCAP/PTPLA, y se destiñeron con una solución de metanol 50%, ácido acético 10% y agua 40%. El marcador de peso molecular usado fue el Novex®Sharp Pre-stained (Invitrogen).

### **Producción de anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA**

La proteína humana recombinante de CAP/PTPLA purificada por afinidad y cargada en un gel SDS-PAGE al 12%, mostró tener una movilidad relativa de 20,000. Esta especie se extrajo del gel, se maceró, se disolvió en 1 mL de adyuvante completo de Freund y se introdujo en el conejo. Para la obtención de anticuerpos un conejo de la cepa Nueva Zelanda se inmunizó por vía subcutánea con hrCAP/PTPLA. En la primera inmunización se le administraron 250 ug de hrCAP/PTPLA con adyuvante completo de Freund, y en las siguientes cuatro inmunizaciones se le administraron 125 ug de hrCAP/PTPLA con adyuvante incompleto de Freund. Mientras que las inmunizaciones se realizaron cada 15 días, la titulación inicial se llevó a cabo después de la tercera inmunización y el conejo se sacrificó después de la quinta inmunización. La producción de anticuerpos policlonales se monitoreó con inmunotransferencias utilizando suero de conejo a una dilución de 500; 1,000; 10,000; 15,000; 20,000 y 30,000. Los anticuerpos IgG se purificaron por cromatografía en una columna de proteína A-sefarosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). La fracción de los anticuerpos policlonales es referida como anti-hrCAP/PTPLA.

## **Cultivo Celular**

Células humanas derivadas de cementoblastos, ligamento periodontal, hueso alveolar y fibroblastos gingivales se cultivaron en medio modificado de Dulbecco's (DMEM), suplementado con suero fetal bovino al 10%, 10,000 unidades/mL penicilina, y 10 µg/mL estreptomina (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambió cada tercer día y después de 14 días de cultivo, las células confluentes se tripsinizaron con Tripsina 0.05% (1x) y EDTA (Invitrogen), se recolectaron, resuspendieron y se centrifugaron a 96 g. Los botones resultantes se usaron para Inmunotransferencia y para QT-RTPCR. Por otro lado, las células destinadas para inmunocitoquímica, se trataron como se describe en inmunotinción.

## **Inmunotransferencia**

Los anticuerpos monoclonales anti-His (C-term) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 3G9 (contra CAP de bovino) se utilizaron para detectar a la proteína hrCAP/PTPLA, y a la proteína CAP/PTPLA, respectivamente. Asimismo, los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA se utilizaron para detectar a la proteína hrCAP/PTPLA.

La proteína hrCAP/PTPLA (5µg/línea) se separó en geles de poliacrilamida al 12% y se transfirió a membranas de nitrocelulosa Immobilon-P (PVDF) (Millipore Corp., Bedford, MA) en una cámara de inmunotransferencia semi-seca TE 70 (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) a 50 mV por un lapso de 1.5 horas. A fin de confirmar la transferencia de la proteína hrCAP/PTPLA, las membranas se sumergieron en Rojo de Ponceau (0.1% Ponceau S p/v en 5% de ácido acético v/v) por 5 minutos, y se lavaron con agua destilada. Por otro lado, el gel se tiñó con SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) por 1 hora a temperatura ambiente, y finalmente, se lavó con agua destilada por 2 horas. Las membranas se bloquearon con amortiguador de Tris conteniendo Tween-20 al 0.15% y leche descremada al 5% a un pH7.4 (TBSTM) por 1 hora en agitación a temperatura ambiente. En seguida, las membranas se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-His (C-term) y anti-3G9 diluídos en TBSTM 1x a una concentración de 1:5000 y 1:1000, respectivamente; o bien con los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA a una dilución de 1:20,000 durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Terminado el tiempo de incubación, las membranas se lavaron con amortiguador de Tris conteniendo Tween-20 al 0.15% (TBST) 1x (3 veces por 10 minutos), e inmediatamente después, se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón o cabra anti-conejo peroxidado a una concentración de 1:1000 y 1:2000, respectivamente, en TBST 1x por 1 hora. Las membranas se lavaron con TBST 1x (3 veces por 10 minutos), y se revelaron por quimioluminiscencia con el sistema Immobilon Western Chemiluminescent HRP (Millipore Corporation, Billerica, MA) en una película KODAK BIOMAX ML (KODAK-Industrie, Cedex, France). El marcador de peso molecular usado fue el Novex®Sharp Pre-stained (Invitrogen).

El Inmunotransferencia también se utilizó para determinar si células humanas derivadas de cementoblastos, ligamento periodontal, hueso alveolar y fibroblastos gingivales expresaban a la proteína CAP/PTPLA. Las células se cultivaron como se detalla en la sección de cultivo celular, y los botones celulares se disolvieron en el amortiguador de lisado conteniendo SDS al 1% y un cocktail de inhibidores de proteasas. La concentración de proteína se determinó con el método de Bradford, y el BSA se usó como estándar. Las proteínas de cada cultivo celular se separaron, transfirieron, tiñeron y bloquearon exactamente igual que para la proteína hrCAP/PTPLA. Las membranas se incubaron con los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA a una concentración de 1:3000 diluído en TBSTM 1x durante toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavaron con TBST 1x (3 veces por 10 minutos), y se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo peroxidado a una concentración de 1:2000 en TBST 1x por 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Nuevamente, las membranas se lavaron con TBST 1x (3 veces por 10 minutos) y se revelaron por quimioluminiscencia con el sistema Immobilon Western Chemiluminescent HRP (Millipore Corporation, Billerica, MA) en una película KODAK BIOMAX ML (KODAK-Industrie, Cedex, France). El marcador usado fue Novex®Sharp Pre-stained (Invitrogen).

## **QT-RTPCR**

El cultivo de células humanas derivadas de cementoblastos, ligamento periodontal, hueso alveolar y fibroblastos gingivales se llevó a cabo como se detalla en la sección de cultivo celular. El ARN total correspondiente a cada línea celular se aisló por medio de Trizol™ Reagent (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN total se determinó por métodos espectrofotométricos estándares. Alícuotas de 0.25µg de ARN total se amplificaron con SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit with ROX (Invitrogen), y con 10 pmol de los primers sentido y antisentido para CAP con secuencias 5' TCC AGA CAT TTG CCT TGC TT 3', y 5' TTA CAG CAA TAG AAA AAC AGC ATG A 3', respectivamente. La reacción de PCR de 25µl se llevó a cabo en un termociclador Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Valencia, Ca) de la siguiente forma: síntesis de ADNc a 50°C por 3 min., desnaturalización a 95°C por 5 min., seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s., 60°C por 30 s., y finalmente, 40°C por 1 min.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se normalizaron con los resultados de GAPDH. Los productos de la reacción se separaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio, se corrieron a 100 mV, se visualizaron en un transiluminador de luz UV y fotodocumentaron con el sistema Kodak EDAS 290 (Kodak, USA).

## **Procesamiento de tejidos periodontales humanos**

Los procedimientos para obtener especímenes humanos de cementoblastos, ligamento periodontal, hueso alveolar y fibroblastos gingivales fueron aprobados por la Junta Revisora de la Facultad de Odontología, y por el Comité de Cuidado Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los especímenes humanos de tejidos periodontales utilizados en esta investigación se obtuvieron de un paciente varón de 29 años en conformidad con la Junta Revisora del Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México, y se procesaron como se describe en Alvarez-Pérez *et al*, (2006). Brevemente, los tejidos se fijaron en formaldehído al 10%, se descalcificaron por 11 meses, se cortaron en secciones de 5 micras de grosor y se montaron en laminillas cubiertas con 2% 3-aminopropyltriethoxysilano (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

## **Inmunotinción**

Para detectar la proteína de CAP/PTPLA en tejidos periodontales humanos las laminillas se desparafinizaron e hidrataron con técnicas de rutina. Brevemente, las laminillas se desparafinizaron en xileno (2 veces por 10 minutos), se hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 90%, 70%, 50% y 30%) durante 1 minuto, seguidas de TBS 1x (1 minuto), y finalmente, a fin de bloquear las reacciones antígeno-anticuerpo no específicas, las laminillas se sumergieron en peróxido de hidrógeno (10 minutos), seguidas de un enjuague en TBS 1x. Los cortes se incubaron con los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA a una concentración de 1:200 diluído en TBS 1x durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron con TBS 1x (3 veces por 5 minutos) y se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo FITC a una concentración de 1:25 diluído en TBS 1x por 1 hora a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, las laminillas se lavaron con TBS 1x, se montaron y analizaron bajo el microscopio de fluorescencia. Con el propósito de identificar la proteína CAP en otros tejidos humanos, laminillas con cortes de riñón, páncreas, pulmón, vesícula, cerebro, bazo, corazón, e hígano se sometieron a los mismos procedimientos de inmunotinción mencionados arriba. Los cortes que se incubaron en ausencia de los anticuerpos primarios sirvieron como controles negativos.

Para la técnica de inmunocitoquímica, las células de las cuatro líneas celulares se llevaron a confluencia y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS 1x pH 7.4 (3 veces por 2 minutos c/u), se resuspendieron y conservaron en la misma solución a -20°C. Para analizar las células, se eliminó el PBS donde se conservaron y se incubaron en PBS 1x con 0.1% Triton 100x (10 minutos), se lavaron con PBS 1x (3 veces por 2 minutos c/u), y se bloquearon con 1% de albúmina en PBS 1x (1 hora). Finalmente, las células se incubaron con los anticuerpos primarios anti-hrCAP/PTPLA (1:200) por 1 hr. a temperatura ambiente, se lavaron con PBS 1x (3 veces por 2 minutos c/u), seguidas por el anticuerpo cabra anti-conejo FITC (1:25) durante 1 hr. y un lavado con PBS 1x (3 veces por 2 minutos c/u). Al final, las laminillas se montaron con DABCO y se analizaron bajo el microscopio de fluorescencia.

### **Hibridación *in situ***

Los cortes histológicos de los tejidos periodontales humanos se procesaron de acuerdo con Oka *et al*, (2008). Brevemente, los tejidos fueron desparafinizados en xileno (2 veces por 10 minutos), e hidratados en concentraciones decrecientes de etanol. Después de la clarificación con PBS 1x, los cortes fueron fijados con PFA 4% (durante 20 minutos), lavados con PBS 1x, 0.2 M HCl (10 minutos), nuevamente lavados con PBS 1x, incubados con Proteinasa K (20 µg/ml) (15 minutos), fijados con PFA 4% (5 minutos), lavados con PBS 1x, y sumergidos en 0.1 M trietanolamina (TEA) conteniendo ácido anhídrido pH 8.0 (10 minutos), seguidos de PBS 1x.

Para la hibridación, las laminillas se incubaron en un ambiente húmedo a 55°C durante toda la noche con la sonda antisentido del gen *CAP* (experimental) y la sonda sentido del gen *CAP* (control), ambas a una concentración de 20ng/30µl diluídas en amortiguador estándar de hibridación y marcadas con Digoxigenina (ver anexo).

Al día siguiente, las laminillas se lavaron con una solución de citratos de sodio (SSC) a una concentración de 5x a 50°C hasta remover la cubrelaminilla; los lavados subsecuentes se realizaron con SSC 0.2x a 50°C (5 veces por 20 minutos) a fin de remover las sondas no hibridizadas; en el último lavado se usó TBS 1x (1 vez por 5 minutos) a temperatura ambiente.

A continuación, los cortes se incubaron con solución bloqueadora (amortiguador 1 [100 mM TrisHCl {pH7.5}, 150 mM NaCl], conteniendo Triton® X-100 al 0.1% y suero normal de oveja al 2% [Sigma]) (30 minutos) a temperatura ambiente, seguidos del anticuerpo secundario ratón anti-DIG acoplado a la enzima fosfatasa alcalina a una concentración de 1:1000 diluído en solución bloqueadora (2 horas). Las laminillas fueron lavadas con amortiguador 1 (2 veces por 10 minutos), incubadas con amortiguador 2 (100 mM Tris-HCl [pH9.5], 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) (10 minutos), y sumergidas en solución colorante (10 ml del amortiguador 2, 45 µl de solución de azul de nitrotetrazolio/NBT, 35 µl de solución 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/BCIP). Una vez logrado el color deseado, la reacción se detuvo con amortiguador 3 (10 mM Tris-HCl [pH 8.1], 1 mM EDTA). Por último, las laminillas fueron lavadas con agua destilada, montadas con DABCO y analizadas bajo el microscopio de luz.



## 9. RESULTADOS

### I. Clonación, expresión y purificación de la proteína hrCAP/PTPLA

Con la finalidad de caracterizar la proteína hrCAP/PTPLA las células de *E.coli* se transformaron con el vector pDEST42/hrCAP/PTPLA, se activaron con IPTG, y se centrifugaron para obtener un botón conteniendo a la proteína hrCAP/PTPLA. Esta proteína, una vez purificada con las columnas de Ni<sup>2+</sup> y HA Ultragel, se observó como una especie con  $M_r$  de ~20,000 (Fig.6, carriles 1-2). Con el objetivo de confirmar que las células de bacteria transfectadas con el vector pDEST42/hrCAP/PTPLA lo incorporaron a su genoma, y llevan con éxito la producción de la proteína CAP/PTPLA, se realizaron inmunotransferencias utilizando los anticuerpos monoclonales anti-His (C-term), y anti-3G9. Las inmunotransferencias revelaron que el anticuerpo anti-His (C-term), y el anticuerpo anti-3G9 reconocen una especie con una  $M_r$  de ~20,000, la cual coincide con las especies identificadas en los geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomassie (Fig.6, carriles 3-4).

### II. Producción de los anticuerpos policlonales contra la proteína hrCAP/PTPLA

Para la producción de los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA, los anticuerpos IgG obtenidos del conejo Nueva Zelanda (previamente inoculado con la proteína hrCAP/PTPLA) se monitorearon por medio de inmunotransferencia. Posteriormente, la proteína hrCAP/PTPLA se corrió en un gel y se incubó con dichos IgG anticuerpos a una concentración de 1:20,000, lo que dio como resultado la identificación de una especie con una movilidad relativa de 20,000 daltons (Fig.6, carril 5).

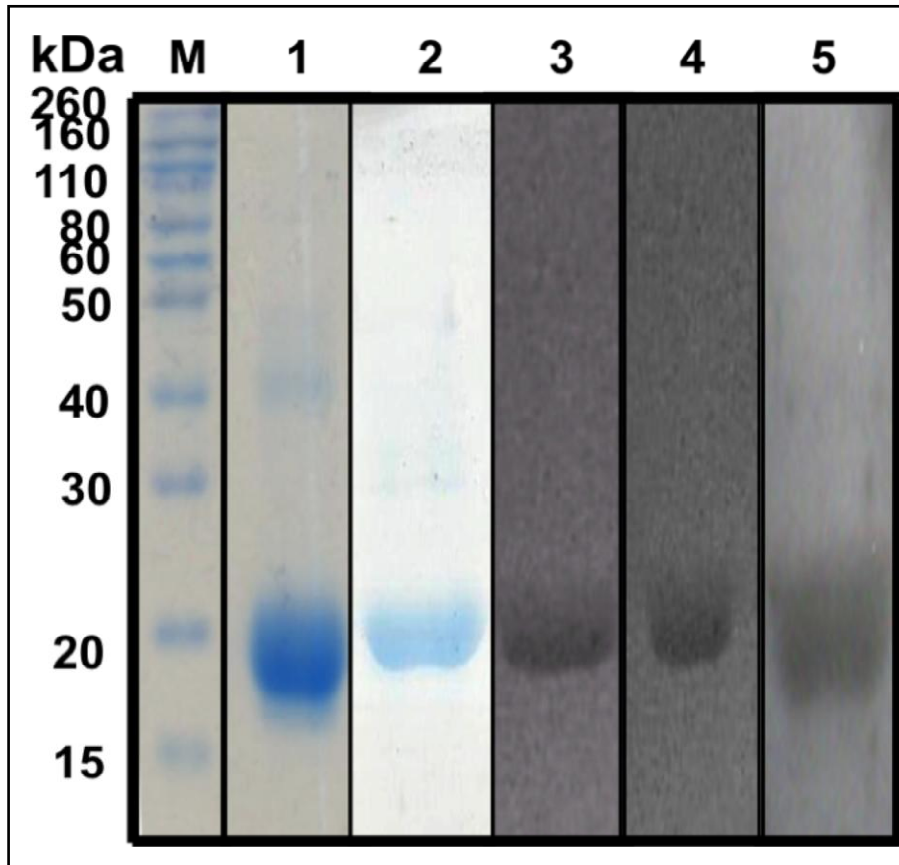


Figura 6. Caracterización de la proteína hrCAP/PTPLA.

Carriles 1 y 2. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con Azul de Coomassie, las especies representan a la proteína hrCAP/PTPLA purificada por cromatografía de afinidad usando  $\text{Ni}^{2+}$ , y por Ultragel HA, respectivamente. En ambos casos, 10  $\mu\text{g}$  de la proteína hrCAP/PTPLA se identificaron como una prominente especie de  $M_r$  ~20,000 daltones.

Los tres carriles siguientes corresponden a tres distintas inmunotransferencias para comprobar la correcta expresión y purificación de la proteína hrCAP/PTPLA. Cinco  $\mu\text{g}$ /línea de la proteína hrCAP/PTPLA se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-His C-term (1:5000) (carril 3), y anti-3G9 (1:1000) (carril 4); así como, con los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA (dilución 1:20,000) (carril 5). El tamaño de las especies encontrada en las inmunotransferencias es similar a las encontradas en los gels de electroforesis teñidos con Azul de Coomassie. M= marcador.

### III. Determinación de la proteína CAP/PTPLA

Para determinar la localización de la proteína CAP/PTPLA, los anticuerpos policlonales anti-hrCAP se utilizaron tanto en células en cultivo como en tejidos periodontales y no periodontales humanos. Para el estudio de Inmunotrasferencia, las proteínas se extrajeron de cultivos celulares de cementoblastos, células del ligamento periodontal, osteoblastos y fibroblastos gingivales; se corrieron en un gel

de poliacrilamida al 12%, y se incubaron con dichos anticuerpos. Los resultados después de la incubación revelaron que CAP/PTPLA se expresa en los extractos de proteína de las 4 líneas celulares periodontales como dos especies, la primera con una movilidad relativa de 40,000 y la segunda de 38,000 daltons (Fig.7).

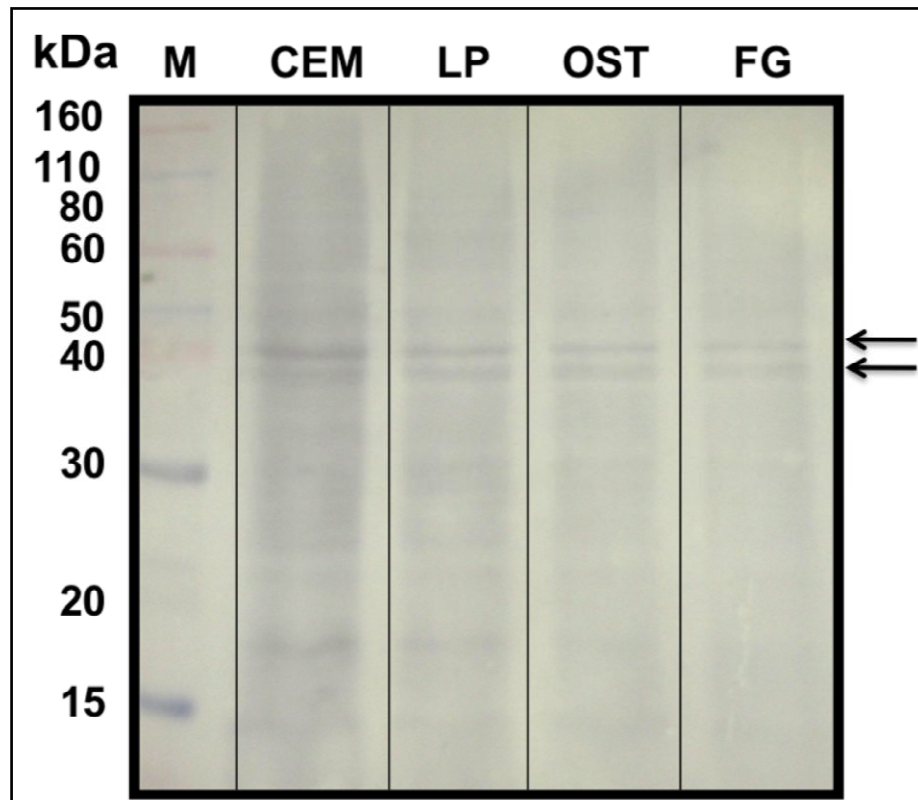


Figura 7. Inmunotrasferencia con los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA. Cinco ug de células derivadas de cementoblastos (carril 1), ligamento periodontal (carril 2), osteoblastos (carril 3), y fibroblastos gingivales (carril 4) se incubaron con los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA (1:3000) y mostraron dos especies de proteína con una  $M_r$  de 40,000 y 38,000 daltones, respectivamente. Las flechas indican la proteína hrCAP/PTPLA a las dos movilidades relativas. M= marcador.

Posteriormente, se investigó la localización de la proteína CAP/PTPLA en células derivadas de tejidos periodontales humanos. Dicha proteína se identificó en el citoplasma, membrana nuclear, núcleo y nucleolo de células del ligamento periodontal y fibroblastos gingivales (Fig.8, B y D). Los cementoblastos mostraron reacción positiva para CAP/PTPLA en el citoplasma, membrana nuclear y núcleo

(Fig.8, A), y los osteoblastos en el citoplasma, únicamente (Fig.8, C). Los controles incubados en ausencia de los anticuerpos primarios fueron negativos (Fig.8, E-H).

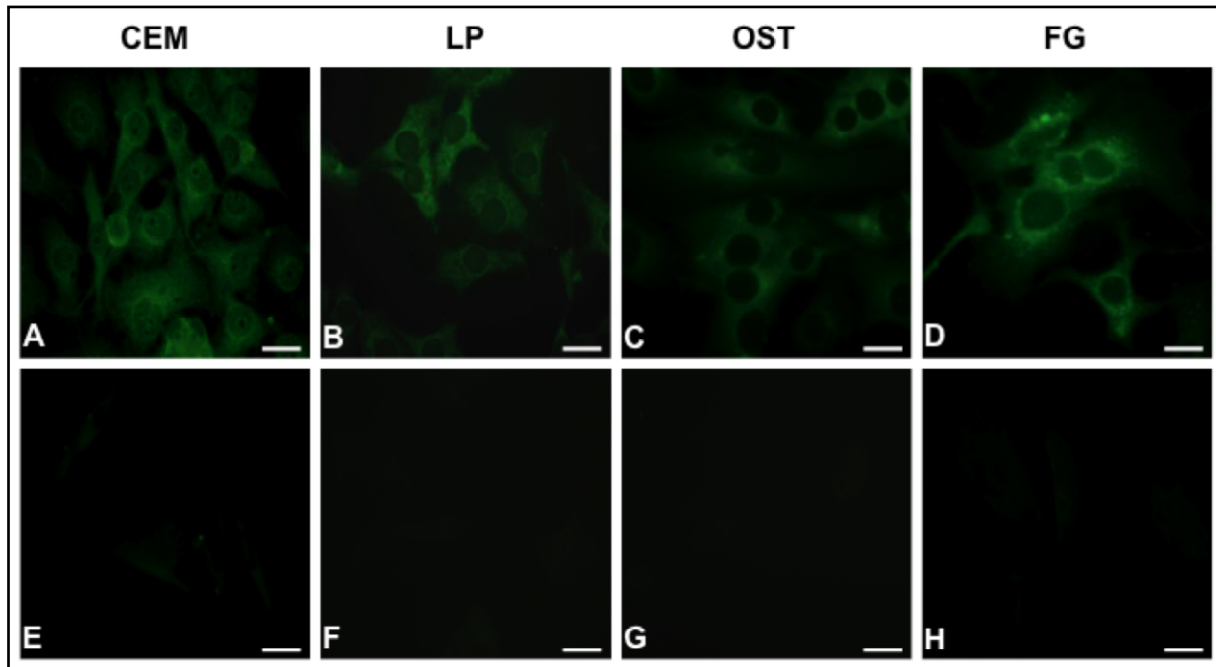


Figura 8. Inmunofluorescencia de células derivadas de tejidos periodontales humanos. Células derivadas de cementoblastos (CEM), ligamento periodontal (LP), osteoblastos (OST), y fibroblastos gingivales (FG), incubadas con los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA a una dilución de 1:200, mostraron reacción positiva para CAP/PTPLA en el citoplasma. E, F, G y H, controles negativos. Barra= 50  $\mu$ m

Además, para corroborar la expresión de CAP *in vitro* con aquella *in vivo*, los tejidos periodontales humanos se incubaron con los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA. El análisis al microscopio de inmunofluorescencia mostró a la proteína CAP/PTPLA en la matriz cementoide a todo lo largo de la raíz (Fig.9, C). Subpoblaciones del ligamento periodontal (Fig.9, B, C, F), y células paravasculares (Fig.9, C) también fueron positivos para CAP/PTPLA; mientras que los cementoblastos se tiñeron intensamente (Fig.9, B, C, E, F).

En el hueso, la señal de CAP/PTPLA se localizó en los osteocitos, en el espacio endosteal y en los osteoblastos (Fig.9, H). En ninguna otra célula se detectó la presencia de CAP/PTPLA. El control utilizando suero pre-inmune de conejo fue negativo.

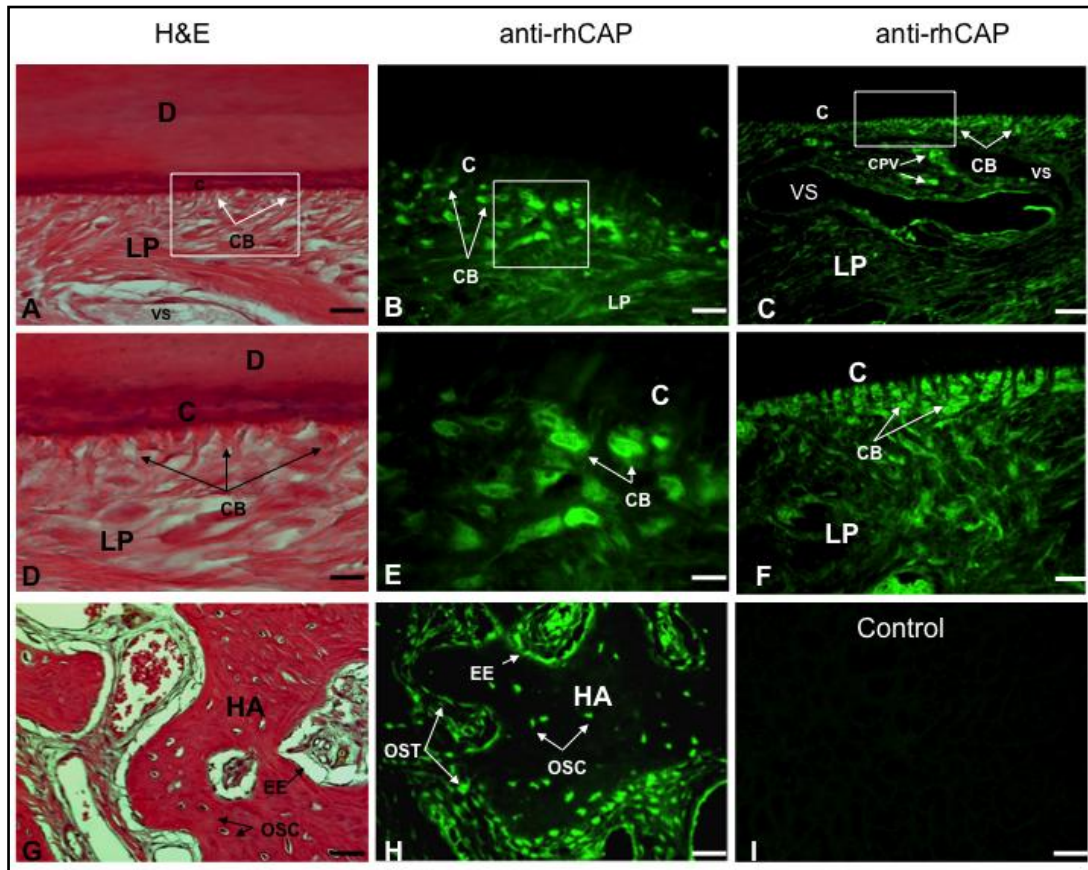


Figura 9. Inmunohistoquímica de tejidos periodontales humanos incubados con los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA.

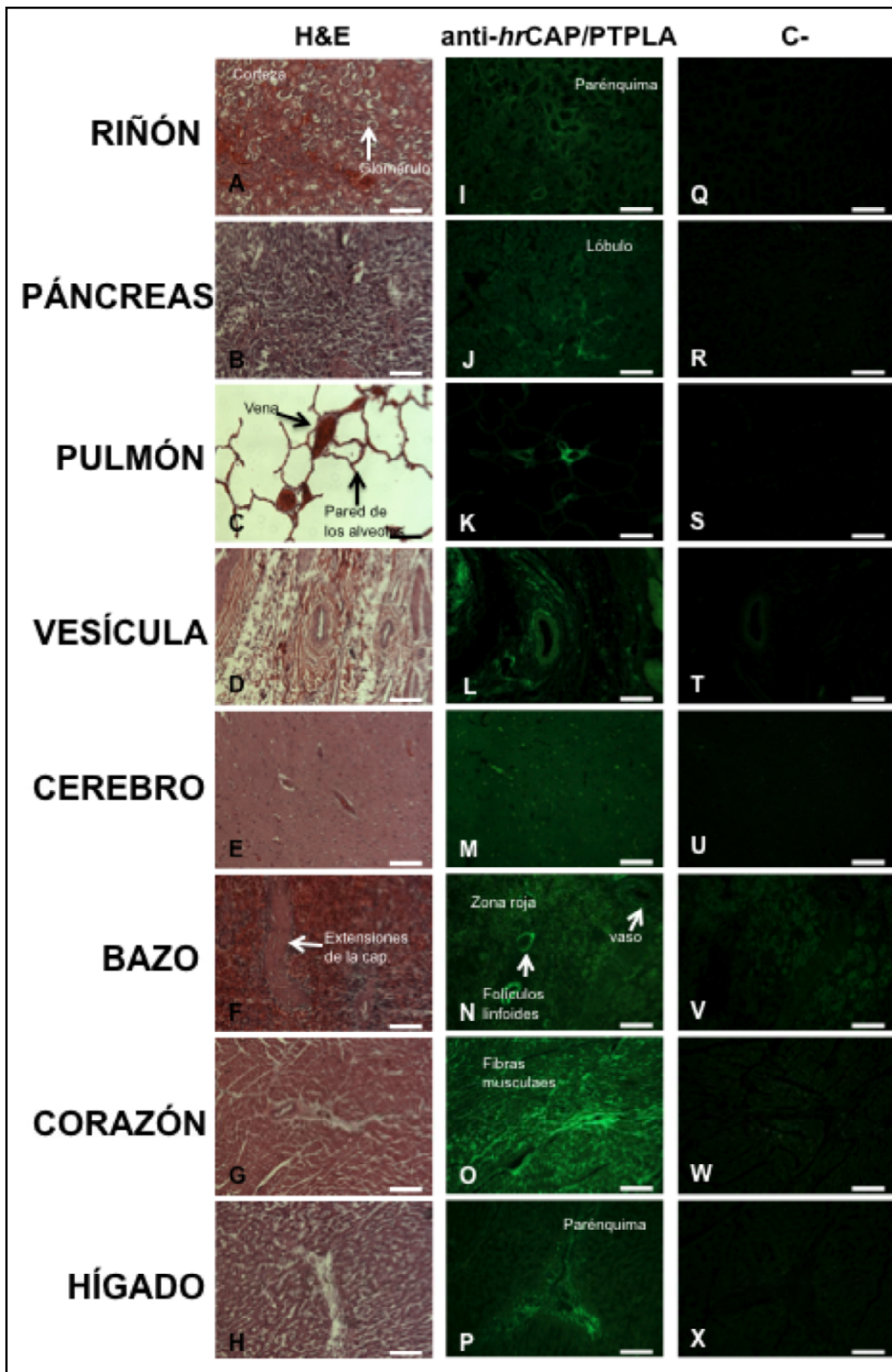
Corte longitudinal de un diente humano teñido con H&E que muestra la dentina (D), el cemento (C), cementoblastos (CB), ligamento periodontal (LP) (Panel A) y un vaso sanguíneo (VS) (Paneles A, D). Hueso alveolar teñido con H&E (G). Todas las muestras experimentales se incubaron con anti-hrCAP/PTPLA a una dilución de 1:200. La matriz cementoide mostró reacción positiva a los anticuerpos a todo lo largo de la raíz (C). CAP/PTPLA se identificó en los cementoblastos (Paneles B, C, E, F), y en subpoblaciones del ligamento periodontal (Paneles B,C,F); así como, en los pericitos de los vasos sanguíneos y en las células paravasculares (CPV) (Panel C). El hueso mostró reacción positiva para CAP/PTPLA en los osteocitos (OCS), osteoblastos (OST) y en el espacio endosteal (EE). El tejido incubado en ausencia de los anticuerpos primarios sirvió como control negativo (Panel I). x20: C,G,H; x40: A,B,F,I; x100: D,E. Barra= 50µm.

Por otro lado, a fin de determinar la existencia de CAP/PTPLA en tejidos no periodontales humanos diversos cortes de riñón, páncreas, pulmón, vesícula biliar, cerebro, bazo, corazón e hígado se prepararon para inmunohistoquímica y se incubaron con anti-hrCAP/PTPLA. La presencia de CAP/PTPLA fue positiva en el estroma del riñón, bazo, e hígado. En el primero, se observó en la corteza alrededor de los glomérulos, es decir, en los túbulos proximales y distales (Fig.10, I); en el segundo en las zonas roja y blanca, y en las extensiones de la cápsula (Fig.10, N); y

en el tercero, en los hepatocitos y en las células de Kupffer (Fig.10, P). En el páncreas, en la vesícula y en el cerebro, CAP/PTPLA se localizó en el estroma (Fig.10, J, L, M); en el pulmón, alrededor de las venas y ligeramente en la pared de los alveolos (Fig.10, K) y en el corazón, en las fibras musculares, en las cuales, la presencia de la proteína fue significativa (Fig.10, O). Los tejidos incubados con suero pre-inmune de conejo fueron negativos.

Figura 10. Inmunolocalización de CAP/PTPLA en diversos tejidos humanos. Paneles I-P muestran cortes de riñón, páncreas, pulmón, vesícula biliar, cerebro, bazo, corazón e hígado, respectivamente incubados con anti-hrCAP/PTPLA a una concentración de 1:200. Una expresión homogénea para CAP/PTPLA se observó en la corteza del riñón tanto en los glomérulos como en los túbulos proximales y distales localizados alrededor de los glomérulos (Panel I); en el lóbulo del páncreas (Panel J); en el cerebro, excepto por algunas células nerviosas que se tiñeron más (Panel M); en la vesícula biliar (Panel L); y en el bazo en su zona roja y en sus folículos linfoides (zona blanca) (Panel N). CAP/PTPLA también se observó en la pared de los alveolos pulmonares (Panel K), y mostró una marcada expresión en las células hepáticas (Panel P) y en las fibras musculares del corazón (Panel O). CAP/PTPLA así como en las células hepáticas y en las células de Kupffer del hígado (Panel P). Paneles Q-X controles negativos. Paneles A-H tinciones de H&E. Barra= 50  $\mu$ m.





## V. Identificación de ARNm de *CAP/PTPLA*

A fin de estudiar el perfil de expresión del ARNm de *CAP/PTPLA* en tejidos humanos, se realizó un PCR de tiempo real con líneas celulares derivadas de cementoblastos, ligamento periodontal, y hueso alveolar. El ARN total se transcribió a ADNc y se analizó con un par de primers específicos para el gen de *CAP/PTPLA*. Los resultados indican la presencia de un amplicón del gen de *CAP/PTPLA* en cementoblastos, mientras que en los osteoblastos y en el ligamento periodontal no se observó ningún amplicón (Fig. 11).

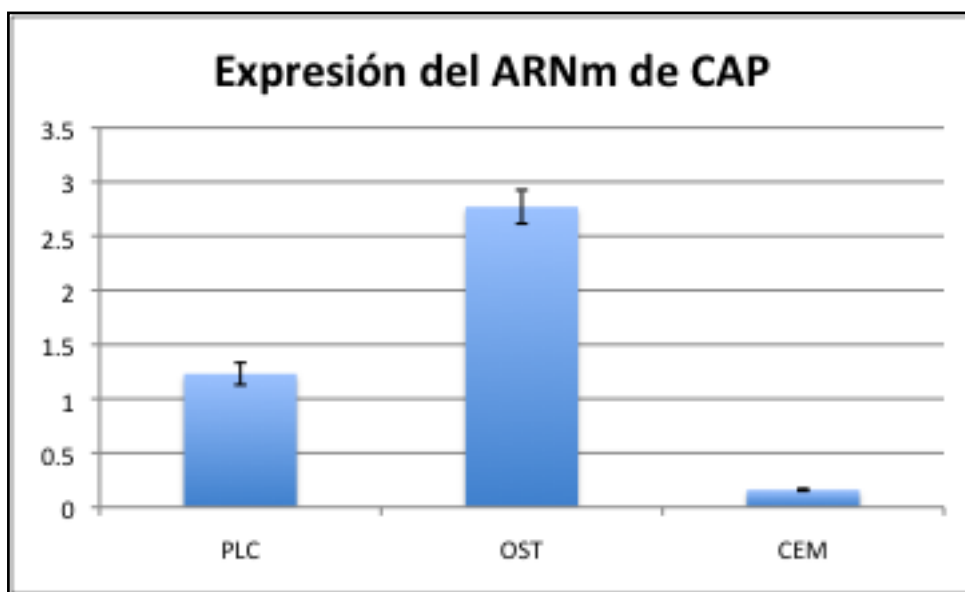


Figura 11. Líneas celulares periodontales humanas (QTRT-PCR). PCR de tiempo real indica la presencia de un amplicón del gen de *CAP/PTPLA* en las líneas celulares derivadas de cementoblastos (CEM), ligamento periodontal (PLC), y hueso alveolar (OST) humanos. En cada reacción se utilizaron 0.25 ug de ARN total de cada línea celular.

Finalmente, el ARNm de *CAP/PTPLA* se detectó en cortes de tejidos periodontales humanos mediante la técnica de hibridación *in situ*. Una intensa y homogénea señal se observó en las células a lo largo del margen del cemento y en el ligamento periodontal (Fig.12, B). A mayor aumento (Fig.12, C y F) se observan cementoblastos positivos para *CAP/PTPLA* organizados en una sola capa a lo largo del cemento.

La capa interna de los vasos sanguíneos y las células paravasculares (Fig.12, G),



así como subpoblaciones del ligamento periodontal fueron positivas para la sonda antisentido de CAP (Fig.12, D); mientras que, en el hueso alveolar (Fig.12, H), y en el control negativo, donde se usó la sonda sentido, ésta estuvo ausente (Fig.12, A).

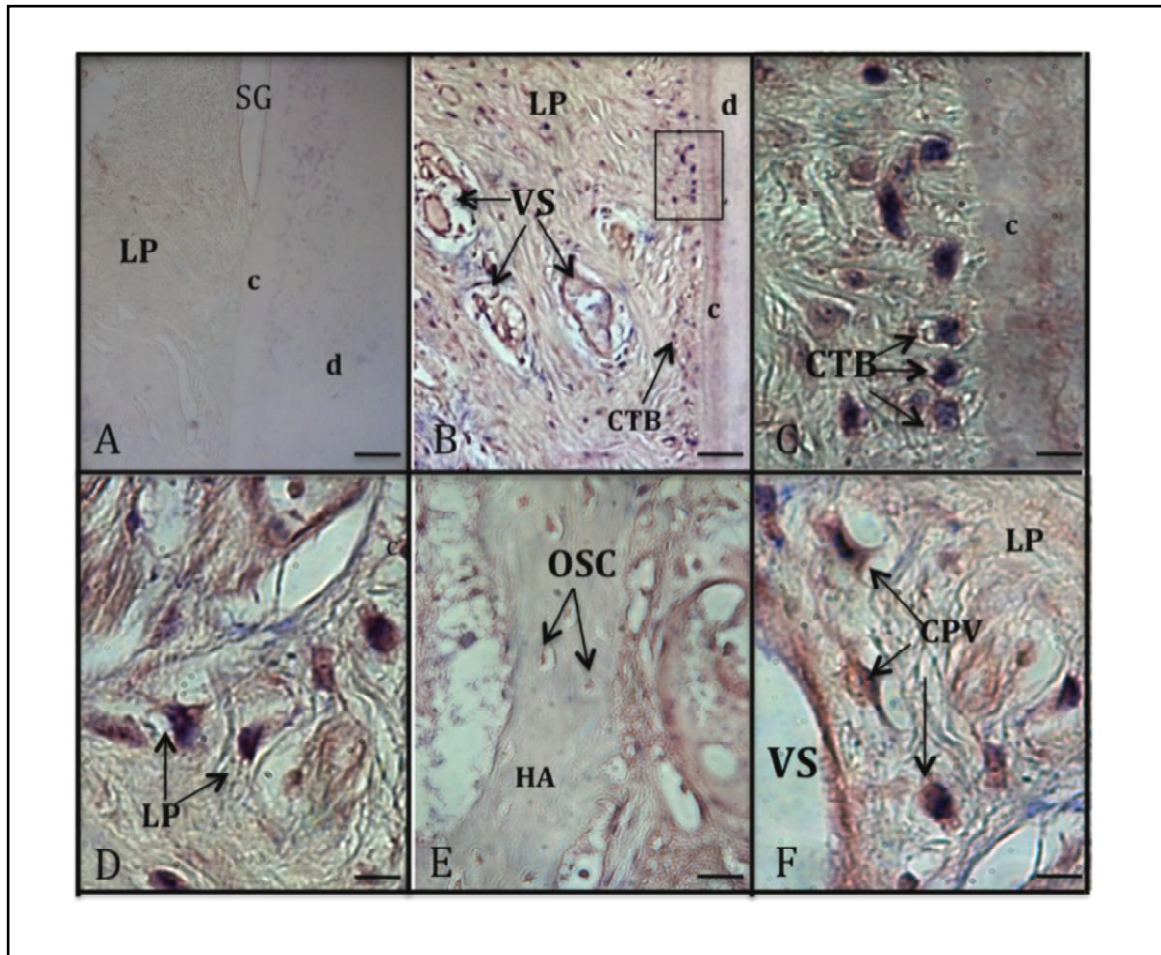


Figura 12. Hibridación *in situ* de tejidos periodontales humanos.

A) En el control negativo, donde se usó la sonda sentido de *CAP/PTPLA*, no se detectó ninguna señal en los tejidos periodontales humanos.

B) Detección del ARNm de *CAP/PTPLA* en tejidos periodontales. Una intensa y homogénea señal se observa en las células a lo largo del margen del cemento y en el ligamento periodontal (LP). El cuadro muestra intensa señal para ARNm de *CAP/PTPLA* en los cementoblastos (CTB), magnificados en el panel C. G) El interior de los vasos sanguíneos (VS), células paravasculares (CPV) y D) subpoblaciones del LP, detectadas con la sonda antisense para *CAP/PTPLA*. H) Células del hueso alveolar (HA) no muestran señal para ARNm de *CAP/PTPLA*. C= cemento, D= dentina, GS=surco gingival, OC= osteocitos. Barra= 50  $\mu$ m.

## 10. DISCUSION

La Proteína de Adhesión del Cemento Radicular (Cementum Attachment Protein o CAP, por sus siglas en inglés) es una proteína que se caracteriza por promover selectivamente la migración, adhesión y mineralización de células putativas cementoblásticas a partir de una población heterogénea de células derivadas del ligamento periodontal (Pitaru *et al*, 1993; Barkana *et al*, 2000). En este tenor, CAP podría jugar un papel importante en la formación y regeneración de tejidos conectivos periodontales afectados por periodontitis. El análisis de la secuencia de CAP en la base de datos GenBank indicó tener similitud con el gen *PTPLA* (también llamado *CAP*), ubicado en el cromosoma humano número 10. *PTPLA* se expresa preferentemente en corazón de feto y de adulto humanos, y en menor grado en músculo esquelético, lo que le adjudica un papel en el desarrollo, diferenciación y mantenimiento de estos tejidos. La secuencia de CAP con ACCESSION/ locus AY455942, tiene 1435 nucleótidos y su marco de lectura abierta codifica para una proteína de 140 aminoácidos (nucleótidos 37 a 457). CAP/PTPLA es un splicing alternativo (isoforma 2) del gen *CAP/PTPLA*.

El análisis *in silico* de CAP/PTPLA muestra que el splicing alternativo ocurre en el sitio activo de PTPLA (isoforma 1), y que sus últimos 15 aminoácidos son únicos y distintos a los de la proteína PTPLA (isoforma 1). Tomando como base esta información y para comprobar la hipótesis de que CAP/PTPLA es una molécula asociada al cemento radicular y un marcador biológico de este tejido, los objetivos de este estudio consistieron en expresar y purificar la proteína recombinante humana de CAP/PTPLA (hrCAP/PTPLA) en un sistema procarionte, y en localizar el ARNm y el producto del gen *CAP/PTPLA* en tejidos periodontales y/o no periodontales humanos. La proteína hrCAP/PTPLA se construyó en un vector de expresión y se purificó a través de las columnas de Ni<sup>2+</sup> HisPrep FF 16/10 y de HA Ultrigel. La elución de CAP/PTPLA de la columna de HA a una concentración de 500 mM de fosfato de sodio, demuestra la alta afinidad de la proteína a este mineral y comprueba estudios anteriores (Pitaru *et al*, 1992). Las proteínas que participan en el proceso de mineralización eluyen a una concentración de 300 mM de fosfato de sodio (Romo-Arévalo *et al*, 2009). Por otro lado, la asociación entre CAP/PTPLA

e hidroxiapatita (HA) resulta importante porque el cemento está constituido en un 50% por matriz inorgánica, y de ésta el 50% es hidroxiapatita (Bosshardt y Selvig, 1997), lo que sugiere que CAP/PTPLA podría participar en el proceso de mineralización del cemento.

La electroforesis mostró que la proteína hrCAP/PTPLA tiene una  $M_r$  de 20,000 daltones, la cual concuerda con los 19.9 kDa originados a partir de los 14.9 kDa de CAP/PTPLA nativa más los 1 + 4 kDa de los epítopes V5 y 6xHis, respectivamente, añadidos en la región carboxilo de la misma. La especie de la electroforesis coincidió con las encontradas en las inmunotransferencias de la proteína hrCAP/PTPLA incubadas con los anticuerpos monoclonales anti-His y anti-3G9, que identifican la cola de 6 histidinas y la proteína CAP de bovino, respectivamente; lo cual, aseguró la correcta expresión, producción y purificación de la proteína hrCAP/PTPLA, y permitió la subsiguiente elaboración de los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA.

Posteriormente, la inmunotransferencia de la proteína hrCAP/PTPLA y su incubación con los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA, resultó en la detección de una especie de  $M_r$  de 20,000 daltones. Puesto que, una banda de movilidad similar fue detectada con el anticuerpo monoclonal anti-3G9, se confirmó la correcta elaboración y la especificidad de los anticuerpos policlonales contra la proteína hrCAP/PTPLA.

En estudios previos, se ha localizado a esta proteína con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CAP de humano en espacios los endosteales del hueso alveolar, células paravasculares, cemento, matriz cementoide (Arzate *et al*, 1992a), cementoblastos (Saito *et al*, 2001) y en células del ligamento periodontal (Barkana *et al*, 1998). En nuestro estudio, los ensayos realizados con los anticuerpos policlonales hrCAP/PTPLA mostraron una distribución muy similar, CAP/PTPLA se identificó en el hueso, matriz cementoide a todo lo largo de la raíz, células paravasculares, en subpoblaciones del ligamento periodontal, y en cementoblastos, tiñéndose estos últimos intensamente. Es de notar que, la tinción positiva en células paravasculares del ligamento periodontal, apoya la teoría de que estas últimas representan progenitores de cementoblastos, los cuales una vez originados en los espacios endosteales del hueso alveolar, viajan a través de los canales vasculares

del mismo, alcanzan las zonas paravasculares del ligamento periodontal, lo cruzan y llegan a la superficie radicular para diferenciarse en cementoblastos (Pitaru *et al*, 1993; Chen *et al*, 2006).

Así pues, una vez que se descubrió que CAP/PTPLA se expresa en tejidos periodontales y por lo tanto, no es una proteína específica de cemento, nos dimos a la tarea de analizar su expresión en cortes de tejidos humanos no periodontales. La detección positiva de CAP/PTPLA en estos tejidos indica nuevamente que esta proteína no es específica de cemento, y además, que podría tener otras funciones además de las migratorias, adhesivas y mineralizantes ya conocidas. En la literatura existen ejemplos de proteínas que a pesar de estar altamente asociadas a tejidos mineralizados (reguladoras de la formación, velocidad y dirección de minerales), también se expresan en tejidos no mineralizados tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Por ejemplo, en el riñón, OPN actúa como inhibidor de mineralización y como antiinflamatorio, al suprimir el crecimiento de cristales de oxalato de calcio, y la producción de óxido nítrico, respectivamente (Denhardt y Guo, 1993). Al igual que los distintos tipos de glucosilación en los proteoglicanos (Hardingham y Fosang, 1992; Kirkpatrick y Selleck, 2007; Kommareddi *et al*, 2007) o de fosforilación en las glucoproteínas (Denhardt y Guo, 1993), determinan sus funciones y distribución en las células, la presencia de CAP/PTPLA en tejidos humanos no periodontales podría estar determinada por el tipo de cinasas presentes en cada célula, así como por el número de fosforilaciones en su secuencia de aminoácidos. De esta manera, si las cinco serinas y dos treoninas de CAP/PTPLA susceptibles de fosforilación (de acuerdo con el análisis *in silico*) están sujetas a distintas cinasas, dejarían abierta la posibilidad de isoformas específicas en tejidos que difieran en sus patrones de fosforilación y por ende en sus funciones.

Otro objetivo de este estudio fue analizar la expresión del ARNm de CAP/PTPLA en tejidos periodontales humanos. A través de hibridación *in Situ*, fue posible detectarlo en cementoblastos a todo lo largo de la línea cementoide, en células paravasculares y en subpoblaciones del ligamento periodontal; sin embargo, a diferencia de la inmunohistoquímica no se encontró ningún mensajero en hueso. Estos resultados se corroboraron con PCR de tiempo real, en el cual los cementoblastos, el ligamento periodontal e interesantemente, el hueso fueron positivos. En particular, la

expresión positiva de este último difiere de aquella del *in situ*, en la cual es negativa; ésto nos lleva a concluir que, el ARNm de CAP/PTPLA se expresa en hueso porque en primer lugar, el PCR de tiempo real es una técnica muy sensitiva, y en segundo, la proteína de CAP/PTPLA está localizada en espacios endosteales, cementoblastos y cementocitos.

En hibridaciones en secciones de ratón, realizadas por Uwanogho y col. (1999), la expresión del ARNm de *Ptp1a* se encontró en el corazón, hígado, pulmón, ganglio trigeminal y raíz dorsal en etapas embrionarias; así como, en el músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, testículo y riñón en etapas posnatales. A través de Northern Blot, Li y col. (2000) reportaron que en el humano la expresión de *PTPLA* está limitada a corazón de feto y de adulto, y en menor medida al músculo esquelético y liso, y concluyeron su participación en el desarrollo y diferenciación cardíacos, así como, en otros eventos celulares. Puesto que, los experimentos de la presente investigación se enfocaron a identificar al mensajero de *CAP/PTPLA* en tejidos humanos periodontales, se sugiere realizar experimentos futuros en tejidos humanos no periodontales para corroborar los estudios anteriores.

En cuanto a la proteína de CAP/PTPLA, esta es la primera vez que se estudia en tejidos humanos no periodontales, y por lo tanto, una comparación con otros estudios es imposible. Sin embargo, cabe mencionar que, la marcada expresión de la proteína en las fibras musculares cardíacas sustenta los reportes de Li y col. (2000) en cuanto a localización del ARNm de *CAP/PTPLA* y además, corrobora la correcta elaboración de los anticuerpos policlonales anti-hrCAP/PTPLA.

La expresión de CAP en el núcleo de células en cultivo, podría estar asociada al papel de estas proteínas como “factores de crecimiento” relacionados con procesos de proliferación y diferenciación (Núñez *et al*, 2010). Por otro lado, la localización en el citoplasma confirma su ubicación citoplasmática en un 94.19%, reportada en los análisis *in silico*. Estos análisis también reportan la ausencia de secuencias específicas determinantes (péptido señal) para el transporte de la proteína hacia la mitocondria, el RE, los peroxisomas, ribosomas, o el núcleo; así como, para su transporte desde la superficie celular hacia Golgi. Sin embargo, CAP se ha identificado como una proteína secretada y de membrana en cultivos celulares de HERS (Zeichner-David *et al*, 2003). FGF2, un factor de crecimiento implicado en el

desarrollo neuronal, vascular y angiogénico, se ha caracterizado por carecer de péptido señal y su secreción al espacio extracelular se lleva a cabo a través de receptores residentes en membrana (Nickel, 2005) y con la ayuda de HSPGs en la superficie celular (Zehe *et al*, 2006). Al igual que FGF2, la secreción de CAP - cuando sucede, y al estar desprovista de péptidos señal- podría estar sujeta a la cascada secretoria no convencional, y de esta forma, su localización en el espacio extracelular se llevaría a cabo a través de receptores residentes en membrana, vesículas intracelulares o por medio de membranas globulares (Nickel, 2005). Claramente, es necesario realizar más estudios a fin de comprobar la secreción de CAP, así como, el método de secreción utilizado por esta proteína.

Finalmente, las dos especies encontradas en la inmunotransferencia de las líneas celulares derivadas de tejidos periodontales humanos podrían ser el resultado de procesos proteolíticos y/o de las modificaciones en residuos aminoacídicos de la proteína CAP/PTPLA, o bien, representar a las dos isoformas del gen *CAP/PTPLA*.

Una alternativa para diferenciar la expresión de CAP/PTPLA de aquella de PTPLA se basa en los últimos 15 aminoácidos de CAP/PTPLA que están ausentes en PTPLA. Para ello, se propone sintetizar un péptido a partir de estos 15 aminoácidos, producir un anticuerpo contra éste y utilizarlo en inmunotinciones y ensayos de actividad biológica que permitan diferenciar ambas proteínas.

## 11. CONCLUSION

*CAP/PTPLA* es un gen nuevo que en base a la expresión de su ARNm y a la localización de su proteína podría participar en distintas actividades. Probablemente, podría tener un papel importante en la cementogénesis, particularmente, en la diferenciación de cementoblastos y en el depósito y mineralización de la matriz de cemento. Pero, la presencia de la proteína en osteoblastos, en ligamento periodontal, y en tejidos no periodontales descarta la posibilidad de considerar al gen y al producto de *CAP/PTPLA* marcadores biológicos del cemento radicular. La regeneración periodontal requiere de la síntesis y remodelación de tejidos epiteliales y conectivos (McCulloch, 1993). Se sabe que esta regeneración depende de la disponibilidad de células apropiadas, factores de inducción, y de la matriz secretada por las células, pero se desconoce el tipo y la cantidad de células y moléculas que deben participar en el lugar y tiempo adecuados, convirtiendo las terapias regenerativas en menos que ideales. En este trabajo, los datos obtenidos sobre *CAP/PTPLA* permiten acrecentar la información existente sobre las moléculas que regulan la formación de los tejidos periodontales durante el desarrollo y la regeneración y por ende, puedan constituir un punto de partida para la elaboración de terapias periodontales fiables. Además, dejan abierta la puerta a nuevas investigaciones que respondan a: ¿cuál es la función de la proteína *CAP/PTPLA* en osteoblastos, ligamento periodontal, y en tejidos humanos no periodontales?, ¿existe otro receptor para *CAP*?, ¿qué modificaciones post-traduccionales ocurren en *CAP/PTPLA in vivo* y cuál es su actividad biológica?, ¿puede *CAP* ser secretada?, ¿qué alteraciones ocurren en los tejidos donde se inhibe *CAP*?, y finalmente, ¿cuál es la actividad biológica de los últimos 15 aminoácidos de *CAP*?

## 12. BIBLIOGRAFIA

1. Alvarez-Pérez, M. *et al*, "Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23)". Bone Vol.38 (2006):409-419.
2. Arzate, H. *et al*, "Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum". FASEB J Vol.6 No.11 (1992a):2990-2995.
3. Arzate, H. *et al*, "Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture". Bone Miner Vol.18 No.1 (1992b):15-30.
4. Arzate, H *et al*, "Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells *in vitro*". J Period Res Vol.33 No.5 (1998):249-258.
5. Bar-kana, I *et al*. "Cementum attachment protein manifestation is restricted to the mineralized tissue forming cells of the periodontium". Eur J Oral Sci. Vol. 106 No.1 (1998):357-64.
6. Bar-kana I. *et al*, "Cementum Attachment Protein Enriches Putative Cementoblastic Populations on Root Surfaces *in vitro*". J Dent Res Vol. 79 No.7 (2000):1482-1488.
7. Bartold, M. *et al*, "Proteoglycans of Bovine Cementum: Isolation and Characterization". Matrix. Vol. 10 (1990).
8. Bartold, M. y S. Narayanan, "Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues". Periodontology 2002. Vol. 40 (2006):29-49.
9. Bosshardt, DD. y A. Nanci. "Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cemenogenesis in porcine teeth". J Clin Periodontol Vol.31 (2004):184-192.
10. Bosshardt, DD. *et al*, "Effects of enamel matrix proteins on tissue formation along the roots of human teeth". J Periodont Res. Vol. 40 (2005):158-167.
11. Bosshardt, DD y Knut Selvig, "Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root". Periodontology 2000 Vol.13 (1997):41-75.
12. Carmona-Rodríguez, Bruno *et al*, "Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts". Biochem Biophys Res Commun Vol. 358 No. 3 (2007):763-769.
13. Chai, Y. *et al*. "Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis". Development Vol. 127 (2000):1671-1679.



14. Chano, L. *et al*, "Emdogain regulation of cellular differentiation in wounded rat periodontium" J. Periodont Res Vol.38 (2003):164-174.
15. Chen, SC. *et al*, "Location of putative stem cells in human periodontal ligament". J Periodont Res Vol.41 (2006):547-553.
16. "Concluyó con éxito la Segunda Semana Nacional de Salud Bucal". México Sano, Diciembre 2008, pág 7. México.
17. Denhardt, David T. y Xiaojia, Guo. "Osteopontin: a protein with diverse functions". The FASEB Journal Vol. 7 (1993):1475-1482.
18. Diekwisch, Thomas. "Developmental Biology of Cementum". Int. J. Dev. Biol. Vol. 45 (2001):695-706.
19. Hakki, Sema *et al*, "Dexamethasone and Basic-Fibroblast Growth Factor Regulate Markers of Mineralization in Cementoblasts In Vitro". J Periodontol Vol. 76 No. 9 (2005):1550-1558.
20. Hardingham, Timothy E. y Amanda J. Fosang. "Proteoglycans: many forms and many functions". The FASEB Journal Vol. 6 (1992):861-870.
21. Gehron, Pamela. "Vertebrate Mineralized Matrix Proteins: Structure and Function" Connectiv Tissue Research Vol. 35 No.1-4 (1996):131-136.
22. Gottlieb, B. "Biology of the Cementum". J. Periodontol. Vol.13 (1942):13-17.
23. Grzesik, Wojciech J., and A.S. Narayanan. "Cementum and Periodontal Wound Healing and Regeneration". Crit Rev Oral Biol Med. Vol.13 No.6 (2002):474-484.
24. Handa, K, *et al*, "Cementum Matrix Formation in vivo by Cultured Dental Follicle Cells". Bone Vol.31 No.5 (2002):606-611.
25. "Bone-grafting materials: Their uses, advantages and disadvantages". J Am Dent Assoc. Agosto 2002, págs. 1125-1126. Estados Unidos.
26. Jin, Q.M. *et al*, "Gene Therapy of Bone Morphogenetic Protein for Periodontal Tissue Engineering ". J Periodontol. Vol. 74, No. 2 (2003):202-213.
27. Kirkpatrick, Catherine A. y Scott B. Selleck. "Heparane sulfate proteoglycans at a glance". Journal of Cell Science Vol.120 (2007):1829-1832.
28. Komaki, M. *et al*, "Role of MAP kinases p42<sup>erk-2</sup>/p44<sup>erk-1</sup> in Cementum-derived Attachment-protein-mediated Cell Attachment". J Dent Res. Vol.79 No.10 (2000):1789-1793.

29. Kommareddi, P.K. *et al*, "Cochlin Isoforms and Their Interaction with CTL2 (SLC44A2) in the Inner Ear". JARO Vol. 8 (2007):435-446.
30. Li, Duanxiang *et al*, "Human protein tyrosine phosphatase-like gene: expression profile, genomic structure, and mutation analysis in families with ARVD". Gene Vol. 256 (2000):237-243.
31. Lin, N-H. *et al*, "Stem cells and periodontal regeneration". Australian Dental Journal Vol.53 (2008):108-121.
32. Liu, HW *et al*, "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 Vol.12 (1997):1691-1699.
33. Luan, X. *et al*, "Evolution and Development of Hertwig's Epithelial Root Sheath". Developmental Dynamics. Vol. 235 (2006):1167-1180.
34. MacNeil, R.L. y Huw F. Thomas, "Development of the Murine Periodontium. I. Role of basement membrane in formation of a mineralized tissue on the developing root dentin surface". J Periodontol Vol.64 No.2 (1993a):95-102.
35. MacNeil, R. Lamont y Huw F. Thomas, "Development of the Murine Periodontium. II. Role of the Epithelial Root Sheath in Formation of the Periodontal Attachment". J Periodontol Vol.64 (1993b):285-291.
36. McAllister, B. *et al*. "Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum". J Periodontal Research. Vol. 25 (1990):99-105.
37. McCulloch, C.A.G. "Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration". Periodontology Vol.1 (1993):16-25.
38. Metzger Z, *et al*, "Differential chemotactic effect of cementum attachment protein on periodontal cells". J Periodontal Res. Vol. 33 No.2 (1998):126-129.
39. Nanci, A. y D.D. Bosshardt. "Structure of periodontal tissues in health and disease". Periodontol 2000 Vol. 40 (2006):11-28.
40. Nakae, Hideaki *et al*, "Isolation and Partial Characterization of Mitogenic Factors from Cementum". Biochemistry Vol. 30 (1991):7047-7052.
41. Narayanan, A. y K. Yonemura, "Purification and characterization of a novel growth factor from cementum". J Periodont Res Vol. 28 (1993):653-665.
42. Nibali, Luigi *et al*, "Review: Periodontal Infectogenomics". Journal of Medical Microbiology Vol.58 (2009):1269-1274.

43. Nickel, W. "Unconventional Secretory Routes: Direct Protein Export Across the Plasma Membrane of Mammalian Cells". Traffic Vol.6 (2005):607-614.
44. Núñez, J. *et al*, "Human cementoblasts express enamel-associated molecules *in vitro* and *in vivo*". J Periodont Res Vol. 45 (2010):809-814.
45. Oka, Kyoko *et al*, "TGF- $\beta$  mediated Dlx5 signaling plays a crucial role in osteochondroprogenitor cell lineage determination during mandible development" Developmental Biology. Vol. 321, No.2 (2008):303-309.
46. Olson, S. *et al*, "Cell Attachment Activity of Cementum Proteins and Mechanism of Endotoxin Inhibition". Journal of Dental Research. Vol.70 No.9 (1991):1272-1277.
47. Orban, B. Histología y Embriología Bucal St. Louis: Ed. Mosby. 1969. Págs. 154-172.
48. Paynter, K.J. y G. Pudy. "A study of the structure, chemical nature, and development of cementum in the rat". Anat.Rec. Vol. 131 (1958):233-252.
49. Pitaru, S. *et al*, "Binding of a cementum attachment protein to extracellular matrix components and to dental surfaces". J Periodontal Res Vol. 27 No. 6 (1992):640-6.
50. Pitaru, S. *et al*, "Molecular and cellular interactions of a cementum attachment protein with periodontal cells and cementum matrix components". J. Periodont. Res. Vol. 28 (1993):560-562.
51. Popowics, T. *et al*, "Defining the Roots of Cementum Formation". Cells tissues Organs. Vol.181 (2005):248-257.
52. Romo-Arévalo, Enrique *et al*, "*In vitro* effects of cementum protein 1 (CEMP1) on calcium phosphate crystal formation and its role during the mineralization process". Mater. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 1244 (2009).
53. Saito, M. y S. Narayanan, "Signaling Reactions Induced in Human Fibroblasts During Adhesion to Cementum-Derived Attachment Protein". JBMR. Vol.14, No.1 (1999):65-72.
54. Saito, M. *et al*, "Expression of Cementum-derived Attachment Protein in Bovine Tooth Germ During Cementogenesis". Bone Vol.29 No.3 (2001): 242-248.

55. Schroeder, H.E., "Origin, Structure and Distribution of cementum and its Possible Role in Local Periodontal Treatment". Periodontology Today (1988):32-40.
56. Slavkin, H. *et al*, "Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium". J Periodont Res Vol. 23 (1988):28-40.
57. Slavkin, H. *et al*, "Human and mouse cementum proteins immunologically related to enamel proteins". Biochimica et Biophysica Acta Vol. 991 (1989):12-18.
58. Somerman, MJ. *et al*, "Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum". Periodont Res Vol.26 (1991):10-16.
59. Strachan, Tom y Andrew P. Read. Human Molecular Genetics 3 Ed. Garland Science. India, 3<sup>a</sup> ed. 2004, pág. 147.
60. Swanson, EC. *et al*, "Amelogenins regulate expression of genes associated with cementoblasts *in vitro*". Eur J Oral Sci Vol.114, Suplemento I (2006):239-243.
61. Taba, M. *et al*, "Current concepts in periodontal bioengineering". Orthod Craniofac Res Vol.8, No.4 (2005):292-302.
62. Ten Cate, AR, "The role of epithelium in the development, structure and function of the tissues for tooth support". Oral Diseases Vol.2 (1996):55-62.
63. Thomas, H.F., "Root formation". Int. J. Dev. Biol. Vol.39 (1995):231-237.
64. Trujillo Nieva, M.R. & H. Arzate. "Expresión de la proteína de adherencia del cemento (CAP) con medios condicionantes de cementoblastos, osteoblastos y células del ligamento periodontal". Division de Estudios de Posgrado e Investigación Año 6, No. 23-24 (2002):26-31.
65. Uwanogho, Dafe A., *et al*, "Molecular Cloning, Chromosomal Mapping, and Developmental Expression of a Novel Protein Tyrosine Phosphatase-like Gene". Genomics Vol. 62 (1999):406-416.
66. Van den Bos, T. y W. Beertsen. "Alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament: age effect and relation to cementum growth rate". J Periodont Res Vol. 34 (1999):1-6.

67. Van Dyke, T. y Sheilesh Dave, "Risk Factors for Periodontitis". J Int Acad Periodontol Vol. 7, No.1 (2005):3-7.
68. Villarreal-Ramírez, E. *et al*, "Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): primary role in biomineralization". Biochem Biophys Res Commun Vol. 384 No. 1 (2009): 49-54.
69. Yamamoto, T. *et al*, "Formation of an alternate lamellar pattern in the advanced cellular cementogenesis in human teeth". Anat Embryol Vol. 196 (1997):115-121.
70. Yamamoto, T. *et al*, "The fibrillar structure of the cemento-dentinal junction in different kinds of human teeth". J Periodont Res Vol.36, (2001):317-321.
71. Yang, Z. *et al*, "Tissue Engineering of Cementum/Periodontal-Ligament Complex Using a Novel Three-Dimensional Pellet Cultivation System for Human Periodontal Ligament Stem Cells". Tissue Engineering: Part C Vol.15, No.00. (2009).
72. Yonemura, K. *et al*, "Isolation and partial characterization of a growth factor from human cementum". Bone and Mineral Vol. 18 (1992):187-198.
73. Zhao, M. *et al*, "Cementoblast Delivery for Periodontal Tissue Engineering". J Periodontol Vol. 75, No.1 (2004):154–161.
74. Zehe, C. *et al*, "Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2". PNAS Vol.103 No.42 (2006):15479-15484.
75. Zeichner-David, M. *et al*, "Role of Hertwig's Epithelial Root Sheath Cells in Tooth Root Development". Developmental Dynamics. Vol. 228 (2003):651-663.

<sup>1</sup>[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/evv.cgi?taxid=9606&contig=NT\\_008705.16&gene=PTPLA&lid=9200&from=17571957&to=17599372](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/evv.cgi?taxid=9606&contig=NT_008705.16&gene=PTPLA&lid=9200&from=17571957&to=17599372)