



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

GENERACIÓN DEL MODELO TRIDIMENSIONAL DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO BIOACTIVO DERIVADO DE LA
PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1) MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. MIKADO ALEJANDRO NIDOME CAMPOS

TUTOR:

Dr. ENRIQUE ROMO ARÉVALO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:

Dr. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Dr. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ABRIL 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Romo Arévalo, por motivarme a iniciar mis estudios de doctorado, por el apoyo brindado durante este proceso, especialmente por creer en mí y formar al hombre que soy actualmente.

A mi comité tutor: Dr. Edgar Zenteno Galindo y Dr. Federico del Río Portilla, por ser mis guías y hacerme sentir capaz en este proceso.

Al M en C Atilano Gutiérrez Carrillo del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la UAM Iztapalapa, por ayudarme en las pruebas piloto de RMN de este proyecto, así como haberme recibido como alumno en sus cursos de RMN.

Al M en C Marco Antonio Vera Ramírez del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la UAM Iztapalapa, por haber contribuido en los inicios de mi formación académica en el campo de la RMN, por el tiempo dedicado a mi persona para comprender el basto mundo del protón.

Al Dr. Federico del Río Portilla del Laboratorio de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la UNAM, por aceptarme como alumno, por compartir su conocimiento conmigo y siempre estar para guiarme. Gracias por sus palabras, su tiempo y, sobre todo, su amistad.

A la Dra. Andrea Estefanía López Giraldo del Laboratorio de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la UNAM por el apoyo brindado para la elaboración de espectros de Resonancia Magnética Nuclear y la elaboración del modelo tridimensional experimental del péptido.

Al Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco del Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM por permitirme trabajar en su laboratorio, por su ayuda en la obtención de espectros de Dicroísmo Circular y por recibirme en sus cursos de Físicoquímica.

Al Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados, por permitirme trabajar en sus instalaciones, así como proporcionarme los insumos y herramientas necesarias para la elaboración de este trabajo.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IA206420.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me brindó como apoyo para realizar mis estudios de doctorado. No. CVU: 773499

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a quién le debo tanto, quien me formó y ahora me permite devolverle el conocimiento que me brindó a través de las aulas como docente.

DEDICATORIAS

A mi madre, este trabajo demuestra que tienes joyas invaluableles en la familia que formaste, piezas dignas que engalanan tu tan codiciada corona. Madre, este logro te lo dedico, tu estuviste siempre para mí sin pedir nada a cambio. Recuerda, la cabeza siempre en alto. Nunca te lo he dicho en persona, pero siempre hay un día para comenzar, madre, te amo.

A mi padre, por apoyarme en este proceso académico y darme sus consejos.

A mis hermanos, Miguel, Marcos y Midori, hermanos, siempre han sido mi motor, una de mis razones para seguir adelante, cada día me siento más orgulloso de ver como logran el éxito académico, profesional y personal, sigan siendo esos buenos hombres y mujer que enorgullecen a la familia, pero sin dejar de ser aquellos niños lindos que recuerdo con cariño.

A Mariana, gracias por enseñarme a creer en mí y en lo que he logrado, por estar a mi lado, apoyarme, motivarme y recordarme siempre el valor y lo bonita que es la vida. Te amo.

A mis amigos: Yahir, gracias por siempre estar y sentirte orgulloso de mi; Daniel, gracias por acompañarme y apoyarme en los momentos más duros de este proceso (Ya puedes llamarme Doctor). A Rafa y Kevin, mis compañeros y amigos en este proceso educativo y de investigación. Gracias por dedicarme su tiempo y sobre todo su incondicional amistad.

A la Dra. Lia Alioth Hoz Rodríguez, gracias por ser uno de los pilares fundamentales en mi formación académica, profesional y personal, sin ti, hace mucho me hubiera derrumbado.

Especialmente dedico este trabajo a mi hermano Mario, me demostraste que siempre habrá algo más complejo con lo cual lidiar, pero sin importar la adversidad, siempre debemos continuar y salir adelante.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	8
MARCO TEÓRICO	11
Periodonto.....	11
Encía	11
Ligamento periodontal	11
Hueso alveolar	12
Cemento radicular.....	12
Niveles de organización estructural de las proteínas	13
Proteínas involucradas en el proceso de biomineralización del cemento radicular.....	14
Fosfatasa alcalina (ALP).....	15
Sialoproteína ósea (BSP)	15
Osteocalcina (OCN).....	15
Osteopontina (OPN)	15
Proteínas cemento específicas: HACD1/CAP y CEMP1	16
Proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP)	16
Proteína del cemento 1 (CEMP-1)	18
Péptido derivado de la proteína del cemento 1 (pCEMP1)	20
Resonancia Magnética Nuclear (RMN) como herramienta para la obtención de estructura tridimensional de biomoléculas.	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
Objetivo General:	24
Objetivos Específicos:.....	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
Síntesis del péptido bioactivo de la proteína del cemento 1 (CEMP-1)	25
Obtención de espectro inicial de RMN de 1D del pCEMP1.....	25
Determinación de estructura secundaria. Adquisición de espectros de Dicroísmo Circular (DC) e inducción del plegamiento.	25

Adquisición de espectros bidimensionales TOCSY (TOtal Corelation SpectroscopY).....	26
Asignación de sistemas de spin	26
Adquisición de espectros NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY/ Espectro de Efecto Overhauser Nuclear).....	26
Asignación de secuencia de aminoácidos y determinación de distancias interatómicas.....	26
Elaboración del modelo tridimensional.....	27
Cálculo estructural	27
Validación del modelo tridimensional y depósito en el PDB.....	27
User guide to the wwPDB NMR validation reports.....	27
Análisis <i>in silico</i> del modelo 3D	28
Análisis de simulaciones <i>in silico</i> de interacción entre moléculas (pCEMP1 e Hidroxiapatita).....	28
Actividad biológica de pCEMP1. Formación de cristales de hidroxiapatita.	28
Caracterización de cristales inducidos con pCEMP1	29
Pruebas de afinidad de pCEMP 1 a Hidroxiapatita.....	29
Análisis del crecimiento de los cristales de Hidroxiapatita con pCEMP1 adsorbido en superficie como reclutador de Calcio	30
Comportamiento de oligomerización/monodispersidad en solución de pCEMP1	30
Análisis experimental <i>del</i> modelo 3D de pCEMP1 y explicación del mecanismo de acción en la formación de cristales de Hidroxiapatita	31
RESULTADOS	32
Síntesis del péptido bioactivo de la proteína del cemento 1 (pCEMP-1) y obtención de espectros iniciales de Dicroísmo Circular y RMN 1D.	32
Estudio de estructura secundaria de pCEMP1 y análisis de espectros de Dicroísmo Circular (D. C).....	35
Estudio de estructura terciaria de pCEMP1 (Construcción del modelo tridimensional de pCEMP1)	38
Adquisición de espectros 1D de RMN.....	38
Adquisición de espectros bidimensionales TOCSY (TOtal Corelation SpectroscopY).....	39
Asignación de sistemas de spin	43
Adquisición de espectros NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY/ Espectro de Efecto Overhauser Nuclear), asignación de secuencia de aminoácidos y determinación de distancias interatómicas ...	48
Elaboración del modelo tridimensional.....	53

Cálculo estructural	53
Validación del modelo 3D de pCEMP1.	57
Gráfico de Ramachandran.....	59
Depósito del modelo tridimensional experimental de pCEMP1 en el Protein Data Bank (PDB)	61
Estudio de estructura cuaternaria de pCEMP1	62
Comportamiento de oligomerización/monodispersidad en solución de pCEMP1	62
Análisis de interacciones intermoleculares de pCEMP1 <i>in silico</i> (Formación de complejos peptídicos).....	64
Ensamble oligomérico.....	64
Análisis de interacciones intermoleculares de pCEMP1 <i>in silico</i> (Formación de complejos peptídicos y su interacción con Hidroxiapatita).	67
Análisis de actividad biológica <i>in vitro</i> . Interacción entre pCEMP1 e Hidroxiapatita en la formación de cristales de hidroxiapatita.....	77
Formación de cristales de hidroxiapatita.....	77
Caracterización de cristales inducidos con pCEMP1	78
Incubación de cristales de Hidroxiapatita con pCEMP1	79
Análisis del crecimiento de los cristales de Hidroxiapatita tratados superficialmente con pCEMP1 como reclutador de Calcio.....	80
DISCUSIÓN	84
CONCLUSIONES	91
PERSPECTIVAS	92
REFERENCIAS	93
APÉNDICE 1	101
APÉNDICE 2	102
APÉNDICE 3	103
APÉNDICE 4	104

LISTA DE ABREVIATURAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
Å	Ángstrom
A	Alanina
AA	Aminoácido
Ala	Alanina
ALP	Fosfatasa alcalina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
BMP	Proteína morfogenética de hueso
BSA	Albumina de suero bovina
BSP	Sialoproteína ósea
C	Cisteína
¹³ C	Carbono 13 (Isótopo)
CARA	Computer Aided Resonance Assignment
CEMP1	Proteína del cemento 1
Cys	Cisteína
D	Ácido aspártico
D2O	Agua Deuterada
DC	Dicroísmo circular
Da	Dalton
DPFGSE	Double Pulsed Field Gradient Spin Echo
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl protecting group
G	Glicina
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
H	Histidina
¹ H	Hidrógeno
His	Histidina
HACD1/CAP	Proteína de adhesión del cemento radicular

HPLC	High performance liquid chromatography
hrCEMP1	Proteína del Cemento 1 recombinante humana
hrHACD1/CAP	Proteína de adhesión del cemento radicular recombinante humana
HRTEM	Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución
kDa	Kilo Dalton
M	Metionina
<i>M</i>	Molar
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
Met	Metionina
µg	Microgramo
mg	Miligramo
MHz	Mega Hertz
µl	Microlitro
mM	Milimolar
<i>Mr</i>	Movilidad relativa
<i>Mw</i>	Peso molecular
N	Asparagina
¹⁵ N	Nitrógeno 15 (Isótopo)
nm	Nanómetro
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
OCN	Osteocalcina
OPN	Osteopontina
pCEMP1	Péptido de CEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRCSTSN)
pp	peak peaking
R	Arginina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
S	Serina
T	Treonina
TFE	2, 2, 2-Trifluoroetanol (CF ₃ CH ₂ OH)
TFED ₂	2, 2, 2-Trifluoroetanol (CF ₃ CD ₂ OH)

TOCSY	TOfal Correlation SpectroscopY
Q	Glutamina

RESUMEN

La proteína del cemento 1 (CEMP1) es una macromolécula cemento-específica conformada por 247 aminoácidos, que regula la actividad de los cementoblastos, induce la diferenciación de células progenitoras hacia cementoblastos y promueve el proceso de mineralización. El aislamiento de la secuencia codificante de esta proteína, su clonación y expresión en sistemas recombinantes ha permitido identificar regiones peptídicas bioactivas que mimetizan funciones de la proteína completa. Una de estas regiones corresponde con los primeros 20 aminoácidos del extremo amino y se ha nombrado como: péptido 1 de la proteína del cemento 1 (pCEMP1: MGTSSSTDSQQAGHRCSTSN). Dicho péptido, ha demostrado la capacidad de promover la nucleación de cristales de hidroxiapatita en sistemas libres de células y más relevante aún, al ser aplicado de manera sistémica en un modelo murino de osteoporosis inducida, se demostró que el péptido revierte el proceso de osteoporosis al inducir la formación de tejido mineral óseo.

El objetivo de este trabajo fue generar el modelo tridimensional experimental del péptido pCEMP1 mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y con ello generar nuevas hipótesis de los posibles mecanismos que posee el péptido para inducir el proceso de mineralización.

Para cumplir los objetivos planteado nuestra metodología consistió en; la síntesis del péptido pCEMP1 mediante el método de fase sólida Fmoc con un 95% de pureza. Con el péptido sintetizado, se realizaron pruebas de estructura secundaria por dicroísmo circular (DC) y se analizó el comportamiento en solución mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Para determinar la estructura tridimensional del péptido se utilizó un espectrómetro Bruker Avance 700 MHz con una sonda de 5.0 mm para colocación de muestras y obtener los espectros 1D y 2D TOCSY y NOESY. Los resultados se procesaron con el software NMRPIPE, mientras que el software CARA 1.5 se usó para identificar sistemas de espín, selección de pico y asignación de señal NOE. Los cálculos estructurales se realizaron con CYANA 2.1. El modelo de proteína se construyó a partir de 20 representaciones estructurales seleccionadas de cálculos sin violaciones y con los valores de energía más bajos. Además de esto, el modelo fue sometido a un ajuste por dinámica molecular en AMBER 9. La estructura final se obtuvo con un RMSD (Root-mean-square deviation of atomic positions) de 0,39, este modelo tridimensional fue depositado en el Protein Data Bank (PDB) con el número de entrada 7TB9 y en el Biological Magnetic Resonance Data Bank (BRBM) con el número de entrada 30978.

El análisis de estructura y asociación intermolecular se desarrolló con el software PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) y el software UCSF Chimera). Mediante el servidor informático I-TASSER se realizó la construcción de modelos teóricos de pCEMP1 y de hrCEMP-1 para hacer análisis comparativos con los modelos experimentales. El análisis de las estructuras generadas se realizó con un comparativo entre modelos teóricos, así como acoplamiento de dinámica molecular entre pCEMP1 experimental y un cristal de Hidroxiapatita. Con el fin de constatar la función biológica de pCEMP1 se llevó a cabo la formación de cristales en el sistema de contradifusión en gel de silicato, con el cual se obtuvieron como resultados estructuras esferoides de Hidroxiapatita del orden de los 400nm, los cuales fueron caracterizados mediante microscopia SEM y HRTEM. Con los cristales de hidroxiapatita formados en el sistema de contradifusión de gel de silicato se emplearon para conocer la interacción entre una estructura mineral y pCEMP1 para dilucidar si las interacciones moleculares entre estos elementos promovían el reclutamiento de calcio y crecimiento de los esferoides mediante fluorescencia, demostrando que pCEMP1 interactúa con la hidroxiapatita promoviendo su crecimiento.

Nuestros resultados demuestran que pCEMP1 en condiciones basales carece de estructura secundaria, pero al promover su plegamiento adquiere estructura de alfa hélice en la región central (SQQAGH). Derivado de los estudios de DC y NMR, hemos obtenido apoyo experimental para poder verificar si los modelos 3D *in silico* son próximos o similares a los experimentales, así como la identificación de las condiciones fisicoquímicas que promueven su plegamiento molecular. Los estudios de fluorescencia ayudan a hipotetizar que pCEMP1 se relaciona directamente con la hidroxiapatita en el proceso de mineralización, reclutando iones calcio y fosfato del medio para fomentar el crecimiento de cristales minerales de hidroxiapatita.

En conclusión, el modelo que realizamos en nuestro proyecto establece el primer resultado experimental sobre la estructura tridimensional de un péptido derivado de una proteína cemento específica. El modelo nos ha ayudado a establecer su mecanismo de acción molecular, principalmente el entender la interacción de la proteína con los iones asociados a la formación de los tejidos mineralizados y su afinidad por la hidroxiapatita.

ABSTRACT

Cementum protein 1 (CEMP1) is a cementum-specific macromolecule made up of 247 amino acids, which regulates the activity of cementoblasts, induces the differentiation of progenitor cells into cementoblasts, and promotes the mineralization process. The isolation of the coding sequence of this protein, its cloning and expression in recombinant systems has allowed the identification of bioactive peptide regions that mimic functions of the complete protein. One of these regions corresponds to the first 20 amino acids from the amino terminus and has been named: peptide 1 of cement protein 1 (pCEMP1: MGTSSSTDSQQAGHRRRCSTSN). This peptide has demonstrated the ability to promote the nucleation of hydroxyapatite crystals in cell-free systems and even more relevant, when applied systemically in a murine model of induced osteoporosis, it was shown that the peptide reverses the osteoporosis process by induce the formation of bone mineral tissue.

The objective of this work was to generate the experimental three-dimensional model of the pCEMP1 peptide using nuclear magnetic resonance (NMR) and thereby generate new hypotheses of the possible mechanisms that the peptide possesses to induce the mineralization process.

To meet the objectives set, our methodology consisted of; the synthesis of the pCEMP1 peptide by the Fmoc solid phase method with 95% purity. With the synthesized peptide, secondary structure tests were performed by circular dichroism (DC) and the behavior in solution was analyzed by dynamic light scattering (DLS). To determine the three-dimensional structure of the peptide, a Bruker Avance 700 MHz spectrometer was obtained with a 5.0 mm probe for sample placement and to obtain 1D and 2D TOCSY and NOESY spectra. Results were processed with NMRPIPE software, while CARRA 1.5 software was used to identify spin systems, peak selection, and produce NOE signal. Structural calculations were performed with CYANA 2.1. The protein model was built from 20 structural representations selected from computations without violations and with the lowest energy values. In addition to this, the model was subjected to molecular dynamics fit in AMBER 9. The final structure was obtained with a RMSD (Root-mean-square deviation of atomic position) of 0.39, this three-dimensional model was deposited in the Protein Data Bank (PDB) with the entry ID 7TB9 and in the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BRBM) with the entry ID 30978.

Intermolecular structure and association analysis was performed with PyMol software (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) and UCSF Chimera software). The theoretical models of pCEMP1 and hrCEMP-1 were built using the I-TASSER computer server to make comparative analyzes with the experimental models. The analysis of the generated structures was carried out with a comparison between theoretical models, as well as molecular dynamics couplings between experimental pCEMP1 and a Hydroxyapatite crystal. To verify the biological function of pCEMP1, the formation of crystals was carried out in the counterdiffusion system in silicate gel, with which spheroid structures of Hydroxyapatite of the order of 400nm were obtained as results, which were characterized by means of SEM and HRTEM microscopy. With the hydroxyapatite crystals formed in the silica gel counterdiffusion system, they were used to determine the interaction between a mineral structure and pCEMP1 to elucidate whether the molecular interactions between these elements promoted the recruitment of calcium and growth of the spheroids by fluorescence, demonstrating that pCEMP1 interacts with hydroxyapatite promoting its growth.

Our results show that pCEMP1 in basal conditions lacks a secondary structure, but upon promoting its folding it acquires an alpha-helical structure in the central region (SQQAGH). Derived from the DC and NMR studies, we have obtained experimental support to be able to verify if the 3D in silico models is close or similar to the experimental ones, as well as the identification of the physicochemical conditions that promote their molecular folding. Fluorescence studies help to hypothesize that pCEMP1 is directly related to hydroxyapatite in the mineralization process, recruiting calcium and phosphate ions from the medium to promote the growth of hydroxyapatite mineral crystals.

In conclusion, the model that we carried out in our project establishes the first experimental result on the three-dimensional structure of a peptide derived from a specific cement protein. The model has helped us to establish its molecular mechanism of action, mainly understanding the interaction of the protein with the ions associated with the formation of mineralized tissues and its affinity for hydroxyapatite.

INTRODUCCIÓN

A pesar de las similitudes que tiene con el tejido óseo, el cemento radicular tiene características únicas que lo pueden diferenciar del hueso; a nivel histológico, tiene un recambio metabólico bajo, carece de inervación, drenaje linfático y de irrigación sanguínea directa. A nivel molecular, a la fecha se han identificado dos proteínas cemento-específicas: 3-Hidroxiacil coenzima A dehidratasa 1/ proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP) y la proteína del cemento 1 (CEMP1), que le proporcionan al cemento radicular la característica de ser considerado un tejido único. (Saygin, 2000)

La proteína del cemento 1 (CEMP1), es una proteína conformada por 247 aminoácidos, de un peso molecular teórico de 25.9 kDa. El gen que codifica para esta proteína se localiza en el cromosoma 16 región p13.3. (Arzate, 2015). Se ha demostrado que esta proteína regula la actividad de los cementoblastos, mediante la inducción de la diferenciación. Tiene una participación en el proceso de mineralización, migración y proliferación de fibroblastos gingivales, además, promueve la nucleación de cristales de fosfato octacálcico, la cual es una fase mineral predecesora de los cristales de hidroxiapatita. (Álvarez, 2006). Estudios de caracterización realizados a la proteína CEMP1 expresada de forma recombinante en *Pichia pastoris* (Romo et al, 2016), han demostrado mediante dicroísmo circular que la proteína tiene un porcentaje de estructura secundaria de 28.6% de hélice alfa, 9.9% de láminas beta y 61.5% de estructura aleatoria. Basados en estudios de secuencias específicas de aminoácidos (aa) de CEMP-1, se hipotetizó que posiblemente algunas regiones de la proteína tendrían una actividad similar a la de la proteína recombinante, pudiendo así mimetizar su función. Con esta premisa, se generaron estudios sobre actividad biológica de los péptidos de CEMP-1. (Salgado, 2017)

Estudios *in vitro* en los cuales se empleó una secuencia peptídica de la proteína del cemento 1 (pCEMP1: MGTSSSTDSQQAGHRRRCSTSN, 20 aa) en sistemas libres de células, han demostrado que pCEMP1 tiene la capacidad de promover la nucleación de cristales de hidroxiapatita (Correa, 2016) como lo hace la proteína CEMP-1.

Además, en un estudio *in vivo* empleando un modelo murino con osteoporosis inducida, se demostró que mediante el empleo de pCEMP1 como terapéutica se induce la regeneración ósea, participa en la nucleación de cristales de hidroxiapatita y controla el proceso de biomineralización *in vivo*. (Salgado, 2017)

Todos estos datos indican que el péptido de CEMP-1 tiene un papel fundamental en procesos de mineralización, sin embargo, no se conocen los mecanismos ni las condiciones que favorecen la actividad biológica de dicha molécula. A la fecha, no se cuenta con modelos estructurales experimentales de ninguna proteína cemento – específica, por lo que es de importancia esté tipo de caracterización para poder comprender los mecanismos y demás regiones que promueve su actividad biológica.

Los principales métodos de caracterización estructural de proteínas son la cristalización de proteínas y su difracción por rayos X y la espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN). La RMN ha demostrado ser una herramienta muy útil en la elucidación de estructuras moleculares como péptidos y moléculas pequeñas, siendo el 8.75% de todas las estructuras depositadas en el Protein Data Bank (PDB) resueltas por dicha técnica. (<http://www.rcsb.org/stats>)

La RMN se utilizó por primera vez en 1946 por Purcell de la Universidad de Harvard y Bloch y Packard de la Universidad de Stanford para obtener el primer espectro con señales separadas de una molécula orgánica (Bloch, 1946; Purcell, 1946). La técnica está basada en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos (Hidrógeno es la aplicación más común) y en la densidad electrónica que rodea, los cuales producen modificaciones débiles pero observables, siendo esos efectos electrónicos los que darán lugar a los desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento, permitiendo así el estudio detallado de la estructura de las moléculas, razón del éxito de la RMN en química orgánica (Wutrich, 2001).

Ciertos isotopos que poseen un momento magnético distinto a cero (^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F y ^{15}N) tienen la capacidad de absorber radiación electromagnética en la región de radiofrecuencias cuando a estos se les aplica un campo magnético externo, la frecuencia de absorción de estos núcleos dependerá del entorno en el que se encuentren, debido a esta característica es que la RMN puede emplearse para determinar estructura molecular (Saunders y Wishnia 1958).

Para poder determinar una estructura, primero se debe hacer un cambio en el tipo de información obtenida, esto se logra con el empleo de la técnica de RMN con transformada de Fourier (FT-RMN). La FT-RMN analiza simultáneamente a todo un rango de frecuencias, estas se encuentran representadas en la muestra (espines nucleares) la cual es sometida a un campo magnético externo constante. Gracias a este principio se pueden obtener los

espectros de los diferentes tipos de núcleos que conforman a una molécula (aminoácidos, en el caso de una proteína (Ernst, 1992). En esta técnica se irradia la muestra con un pulso electromagnético de corta duración, en la región de las radiofrecuencias, generando un movimiento de precesión en el núcleo. Los espines se comportan como pequeños imanes que generan su movimiento de precesión en una frecuencia característica, que induce una corriente de radio frecuencia de tipo oscilante en una bobina receptora que se encuentra alrededor de la probe (sonda) donde se coloca la muestra. Posteriormente, al finalizar el pulso, los núcleos regresaran a su estado de equilibrio inicial, produciendo una señal que decae en intensidad hasta llegar a cero (FID) (Free Induction Decay/Caída de inducción libre) (Ernst, 1992). La FID contiene información de todas las señales generadas en el espectro, se observa como una onda que decae en relación con el tiempo y mediante el empleo de una función matemática (transformada de Fourier) se genera el espectro de RMN, donde se observan las señales de cada átomo por separado permitiendo así su interpretación (Ernst, 1992).

Cuando se incrementa el tamaño de las moléculas el número de señales es tan grande que hay traslape, por lo que es necesario dispersarlas en al menos otra dimensión. En la FT-RMN multidimensional, se aplican al menos dos pulsos, separados por periodos de espera que van incrementando paulatinamente (periodo de mezclado), obteniendo así múltiples espectros de 1D, a los que se les aplica una segunda transformada de Fourier. Estos experimentos se pueden clasificar en los siguientes tipos: Correlacion homonuclear, en los cuales todas las dimensiones corresponderán a un solo núcleo (^1H), como son el COSY (COrrelation SpectroscopY), TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY), NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) y ROESY (Rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy) (Marius, 1994) y de correlación heteronuclear, en los que los espectros obtenidos correlacionan a núcleos distintos (^1H y ^{13}C o ^{15}N) como lo es el HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) (Massou, 2007).

Gracias a las contribuciones de Richard Ernst (1991) y Kurt Wüthrich (2002) en el desarrollo de la RMN de dos dimensiones y multidimensional con transformada de Fourier, se expandió la RMN en el campo de la bioquímica, específicamente en la determinación de estructura de biopolímeros como proteínas en disolución, teniendo así, a la RMN como una nueva herramienta confiable para dilucidar estructuras de moléculas orgánicas, organometálicas o biológicas (Jardetzky y Jardetzky, 1958).

MARCO TEÓRICO

Periodonto

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

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

Encía

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

Ligamento periodontal

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

Hueso alveolar

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

Cemento radicular

El cemento radicular es un tejido que se encuentra sobre la superficie radicular del órgano dental, desde la unión cemento-esmalte localizada en el cuello del diente hasta el ápice de este. Está conformado aproximadamente por un 50% de contenido orgánico, principalmente por hidroxiapatita y de un 50% de contenido orgánico. De este porcentaje el principal elemento es la colágena tipo I (90%), colágena tipo III (5%) y en menor proporción colágena tipo XII, proteínas no colagénicas como la BSP, DMP-1, FN, OCN, ON, OPN y algunos factores de crecimiento (Arzate, 1996; Garant, 2003). A pesar de que el contenido estructural de este tejido es muy similar a la del hueso alveolar difieren en que el cemento radicular carece de irrigación, inervación y drenaje linfático propio; además, en su composición se encuentran dos proteínas cemento-específicas: la proteína del cemento 1 (CEMP-1) y la 3-Hidroxiacil coenzima A dehidratasa 1/ proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP). Estas proteínas solamente se expresan en este tejido, por lo cual deben tener un papel fundamental en procesos relacionados con la producción de cemento *de novo*, la regulación de expresión de células involucradas en el proceso de remineralización y por ende en cualquier proceso relacionado con mantener la homeostasis de este tejido. Sin embargo, debido a la disposición anatómica de dicho tejido y de la cantidad sobre la superficie radicular dental, hace muy difícil su obtención para poder aislar y estudiar a dichas proteínas cemento específicas, por lo tanto, permanece como el tejido mineralizado menos estudiado del cuerpo humano (Romo, 2016).

Niveles de organización estructural de las proteínas

Las proteínas pueden presentar cuatro niveles de organización, el primer nivel, la estructura primaria, está dada por la secuencia de aminoácidos unidos entre si mediante un enlace covalente denominado enlace peptídico. En el segundo nivel de organización, la estructura secundaria, la cadena polipeptídica opta por dos acomodos estructurales, las hélices alfa: producto de un enrollamiento helicoidal sobre si misma de la estructura primaria y la lámina beta: una disposición en zigzag de la cadena. Además, existen múltiples formaciones de giros de las cadenas polipeptídicas o acomodos aleatorios que difieren de las clasificaciones antes mencionadas (random coil). Este tipo de organización están estabilizados por enlaces “débiles”, como lo son los puentes de hidrogeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrófobas (Lehninger, 2009).

La estructura terciaria es el plegamiento de la estructura secundaria en un acomodo tridimensional que hace que las proteínas monoméricas adquieran una función específica. Los enlaces característicos de este tipo de nivel de organización resaltan los puentes disulfuro y múltiples interacciones débiles, estas interacciones pueden ser modificadas por diversos agentes que se encuentren en la solución proteica, ya que, un incremento o disminución de la carga iónica de los solutos en solución puede alterar la disposición de moléculas y la interacción entre ellas, formando nuevos enlaces o rompiéndolos. En el último nivel de organización, estructuras cuaternarias, múltiples cadenas polipeptídicas con una disposición de estructura terciaria se unen mediante enlaces covalentes, formando un complejo proteico que puede llegar a tener múltiples funciones (Lehninger, 2009). Dentro de estas funciones se encuentran aquellas que pueden llevar a cabo actividades catabólicas, anabólicas, señalización celular, eventos de transcripción y traducción en procesos genómicos; técnicamente este último nivel de organización lleva a cabo actividades celulares importantes, por lo cual, su estudio se convierte en una actividad muy relevante para la comprensión de los procesos biológicos.

La importancia de conocer cuál es el nivel de organización de una proteína, radica en gran medida cuál es su papel dentro de un proceso biológico. Como ejemplo, podemos mencionar al proceso de mineralización, el cual se da en múltiples organismos como reptiles, aves, peces, las conchas de algunos moluscos y en los mamíferos, en la formación de hueso, esmalte, dentina y cemento radicular dental (Atala *et al*, 2011).

Dependiendo del acomodo que adquiera la proteína (estructura secundaria: hélices alfa, láminas beta, terciaria y cuaternaria), del medio y las condiciones en las que se encuentre, podrá dar pie a que lleve a cabo diversas actividades que en gran parte dependen de la información de secuencia de la proteína (motivo) y de su capacidad para tener una actividad específica (dominio) lo que puede promover la formación de un sitio de unión, interacciones interatómicas, interacciones intermoleculares de tipo estructural o metabólico (Nicholas, 2016). En el caso del proceso de mineralización se necesitan múltiples proteínas con actividad reclutadora, de andamiaje y direccionamiento del crecimiento de estructuras minerales, en primera instancia el reclutamiento de iones (calcio o fosfato) se da a partir del medio en el que se encuentren (intra o extra celular) o de otras biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas), se debe de propiciar la precipitación de iones para que se inicie la nucleación de una estructura mineral mayor y finalmente se tiene el papel de regular, direccionar y mantener el crecimiento de las estructuras mineralizadas que componen a un organismo vivo. (Sharma, 2020)

Proteínas involucradas en el proceso de biomineralización del cemento radicular

Como se mencionó anteriormente en el proceso de biomineralización participan múltiples proteínas que tienen diversas funciones, desde ser las responsables de obtener sustratos minerales del medio, precipitar sales minerales, formar el núcleo de crecimiento de cristales de calcio y organizar la agregación y posterior crecimiento mineral. La nucleación de dichos cristales puede ser de tipo homogénea, si en el proceso se ven involucrados solamente la saturación de minerales que forman los cristales, o de tipo heterogénea si además de existir la saturación local de minerales están involucradas macromoléculas como proteínas que promueven la formación de estos cristales. Este último tipo de nucleación es el que se lleva a cabo en los seres vivos (Arzate, 2015; Nakae y Narayanan, 1991). Muchas de las proteínas asociadas al proceso de biomineralización, además de la característica del proceso biológico como un común denominador, hasta la actualidad no han podido ser estudiadas estructuralmente en su totalidad, sus regiones biológicamente activas con secuencias que optan por la organización en estructura aleatoria con función en el proceso de biomineralización.

Fosfatasa alcalina (ALP)

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

Sialoproteína ósea (BSP)

La sialoproteína ósea es un componente importante de la matriz mineralizada del hueso, dentina, cemento y cartílago calcificado. (UniProtKB - P21815). La BSP es una fosfoproteína de la matriz extracelular de hueso, aislada a partir de hueso cortical con un peso aproximado de 23,000 Da, sin embargo, presenta una movilidad relativa de 60-80,000 Da en geles SDS-PAGE, el cual muestra una gran diferencia en peso teórico obtenido a partir de su secuencia de aminoácidos (Hernández, 2011). El papel de esta proteína es el de servir como nucleador de cristales de hidroxapatita durante el proceso de biomineralización y se le ha considerado como un marcador de la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos (Kagayama, 1998; Roach, 1994).

Osteocalcina (OCN)

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

Osteopontina (OPN)

También llamada sialoproteína ósea I (BSPI) es una proteína con un peso molecular teórico de 35.4 kDa. En su secuencia contiene múltiples sitios putativos de unión a hidroxapatita, tiene la capacidad de unirse a colágena, fibronectina y osteocalcina. (UniProtKB - P10451). Esta proteína puede ser localizada en el frente de mineralización de hueso, aunque se ha encontrado en múltiples sitios no mineralizados como el riñón y secreciones como saliva,

leche y bilis. Las funciones principales de esta proteína son el regular la adhesión celular, regular la actividad osteoclástica y la regulación de la mineralización de la matriz extracelular (Bartold, 1998).

Proteínas cemento específicas: HACD1/CAP y CEMP1

Proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP)

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

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

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

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

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

Estudios han demostrado que la expresión de HACD1/CAP de forma recombinante en células de *E.coli* han permitido la producción de rendimientos altos de hr HACD1/CAP para hacer pruebas bioquímicas, estructurales y de actividad biológica *in vitro* como *in vivo*, ofreciendo así una alternativa viable para la obtención de la proteína HACD1/CAP y no depender de su fuente nativa, la cual había sido un problema para su obtención y estudio (Nidome, 2018).

Estructuralmente HACD1/CAP presenta un alto contenido de estructura aleatoria y múltiples estados de oligomerización influenciados por carga iónica y pH. Bioquímicamente es termoestable siempre que se mantenga en un rango de pH fisiológico (Nidome, 2018)

HACD1/CAP es una proteína intrínsecamente desordenada compartiendo esta característica con múltiples proteínas que están asociadas a procesos de biomineralización como la ALP, OCN y en procesos específicos de mineralización de órganos dentales, CEMP-1. Su papel primordial radica en la nucleación, regulación y direccionamiento del crecimiento de cristales de hidroxiapatita, por lo cual su participación en los procesos de biomineralización es importante (Nidome, 2018).

Proteína del cemento 1 (CEMP-1)

Es una proteína conformada por 247 aminoácidos, de un peso molecular teórico de 25.9 kDa. El gen que codifica para esta proteína se localiza en el cromosoma 16 región p13.3 (Arzate y Olson, 1992). Se ha demostrado que esta proteína regula la actividad de los cementoblastos, mediante la inducción de la diferenciación. Tiene una participación en el proceso de mineralización, migración y proliferación de fibroblastos gingivales; además, promueve la nucleación de cristales de fosfato octacálcico, la cual es una fase mineral predecesora de los cristales de hidroxiapatita. (Álvarez, 2006).

Estudios de caracterización realizados a la proteína CEMP1 expresada de forma recombinante en *Pichia pastoris* (Romo et al, 2016) han demostrado que esta se encuentra glicosilada y presenta un porcentaje de estructura secundaria de 28.6% de hélice alfa, 9.9% de láminas beta y 61.5% de estructura aleatoria, este último dato es una característica de múltiples proteínas asociadas al proceso de biomineralización (Romo, 2014). Debido a la naturaleza de esta proteína y de su ubicación anatómica ha hecho muy difícil la obtención de esta, CEMP1 expresada en forma recombinante es una metodología que ha demostrado una importante eficacia al proporcionar cerca de 1mg de esta proteína por cada litro de cultivo de *Pichia pastoris*. (Romo et al, 2016).

La estabilidad de CEMP-1 expresada de forma recombinante depende de las condiciones fisicoquímicas del medio, ya que esta se ve favorecida cuando existe una interacción con aminoácidos ácidos, glicina, péptidos derivados de fosfoproteínas como la tripona y una alta concentración de fosfato y pH ácido. Además, el único ligando específico reportado a la fecha de esta proteína en el carbohidrato manopiranosido, esto en gran medida a que CEMP-1 posee actividad tipo lectina. (Romo, 2014)

CEMP-1 y su participación en el proceso de biomineralización radica en la capacidad de nucleación, regulación y crecimiento de cristales de fosfato de calcio, el cual es un precursor estructural de la hidroxiapatita, el componente inorgánico principal de los huesos. Esta característica también la ha demostrado la proteína CEMP-1 expresada en forma recombinante. (Álvarez, 2006; Romo, 2014).

Finalmente, se ha demostrado que la transfección del gen de CEMP-1 a células de mamífero de linaje no mineralizante (Fibroblastos Gingivales Humanos) promueve la expresión en estas células de proteínas de linaje mineralizante que participan en el proceso de biomineralización como la ALP, OCN, OPN, HACD1/CAP y la misma CEMP1. Aunado a esto, la tinción con alizarina roja de las placas de cultivo de estas células transfectadas presentan la coloración y aumento de nódulos minerales. (Hoz *et al*, 2011)

10	20	30	40	50
MGTSSTDSQQ	AGHRRRCSTSN	TSAENLTCLS	LPGSPGKTAP	LPGPAQAGAG
60	70	80	90	100
QPLPKGCAAV	KAEVGIPAPH	TSQEVRIHIR	RLLSWAAPGA	CGLRSTPCAL
110	120	130	140	150
PQALPQARPC	PGRWFFPGCS	LPTGGAQTIL	SLWTWRHFLN	WALQQREENS
160	170	180	190	200
GRARRVPPVP	RTAPVSKGEG	SHPPQNSNGE	KVKTITPDVG	LHQSLTSDPT
210	220	230	240	
VAVLRAKRAP	EAHPPRSCSG	SLTARVCHMG	VCQGQGDTE	GRMTLMG

Secuencia de aminoácidos de la Proteína del Cemento 1 (CEMP-1) (Entrada: UniProtKB – Q6PRD7)

Péptido derivado de la proteína del cemento 1 (pCEMP1)

El empleo de proteínas recombinantes ha proporcionada una estrategia viable de accesibilidad a grandes cantidades de proteína que no podrían ser asequibles por la naturaleza de su fuente nativa, como fue el caso de la insulina (Riggs,1980) o específicamente hablando de proteínas del cemento radicular a hrHACD1/CAP (Nidome, 2018) y hrCEMP1 (Romo, 2016). Aunque la expresión de proteínas humanas de forma recombinante se ha convertido en una herramienta biotecnológica que ha ayudado a resolver múltiples problemas médicos, aún queda claro que estos procesos requieren de diversas técnicas para clonar, expresar y purificar la proteína, lo que a largo plazo eleva los costos del proceso. Debido a esto y con los antecedentes de la purificación de hrCEMP-1 y su potencial biológico mineralizante (Romo, 2016), se hicieron análisis de secuencia para determinar si existía la posibilidad de que una región específica de CEMP-1 pudiera mimetizar la actividad biológica de la proteína nativa, con la finalidad de disminuir los tiempos de trabajo y costos de producción. Con dichos antecedentes se optó por emplear la técnica de síntesis de fase sólida FMOC/tBu para obtener el primer péptido derivado de la Proteína del Cemento 1 (pCEMP1), de esta forma se obtuvo un péptido liofilizado conformado por los 20 aminoácidos del extremo amino terminal que conforman a pCEMP-1 (MGTSSTDSQQAGHRRRCSTSN).

10	20	30	40	50
MGTSSTDSQQ	AGHRRRCSTSN	TSAENLTCLS	LPGSPGKTAP	LPGPAQAGAG
60	70	80	90	100
QPLPKGCAAV	KAEVGIPAPH	TSQEVRIHIR	RLLSWAAPGA	CGLRSTPCAL
110	120	130	140	150
PQALPQARPC	PGRWFFPGCS	LPTGGAQTIL	SLWTWRHFLN	WALQREENS
160	170	180	190	200
GRARRVPPVP	RTAPVSKGEG	SHPPQNSNGE	KVKTITPDVG	LHQSLTSDPT
210	220	230	240	
VAVLRAKRAP	EAHPPRSCSG	SLTARVCHMG	VCQGQGDTE	GRMTLMG

Secuencia de aminoácidos de la Proteína del Cemento 1 (CEMP-1) (Entrada: UniProtKB – Q6PRD7). En el recuadro rojo se observan los 20 aminoácidos del extremo amino terminal que conforman al péptido 1 de CEMP-1 (pCEMP1).

En las últimas décadas se han realizado estudios a más de 7000 péptidos con funciones fisiológicas humanas de importancia, como los factores de crecimiento, ligandos de canales iónicos, hormonas neurotransmisoras y de efecto antimicrobiano. Los péptidos son moléculas selectivas de señalización, las cuales tienen alta afinidad a receptores celulares específicos como canales iónicos o receptores acoplados a proteína G, los cuales desencadenan un efecto intracelular específico para llevar a cabo una función; además tienen un perfil farmacológico y propiedades atractivas, lo que representa un interesante punto de partida para diseñar nuevas terapias, debido a su especificidad, perfiles de seguridad, tolerabilidad y eficacia en seres humanos, además, las terapias con péptidos biofuncionales se han asociado con un proceso de producción de menor complejidad en comparación con biofármacos basados en proteínas, reduciendo así los costos de producción (Fosgerau, 2015; Behrendt *et al*, 2016)

Como se ha mencionado, las ventajas de llevar a cabo la síntesis de péptidos bioactivos son numerosas, en especial, los bajos costos en producción y su eficacia como terapéutica. Con la técnica de síntesis de fase sólida FMOC/se obtuvo pCEMP1 (MGTSSTDSQQAGHRRRCSTSN), el cual, ha demostrado tener actividad biológica relacionada con procesos de biomineralización *in vitro* (Correa, 2018), dicha actividad está involucrada con la formación de estructuras minerales de Fosfato Octacálcico, un precursor de la hidroxiapatita y principal componente inorgánico del hueso, estas son estructuras esferoides de diámetro alrededor de los 600nm y que tienen como singularidad el crecimiento radial en espículas. Este tipo de formación de estructuras compuestas por Hidroxiapatita o precursores moleculares/estructurales es característica de proteínas que están relacionadas en procesos de biomineralización (Villareal E, et al 2009; Fan D, et al 2011; Romo E ,2016; Nidome, 2018).

Finalmente, estudios *in vivo* en modelos murinos con osteoporosis inducida, han demostrado que mediante el empleo de pCEMP1 como terapéutica, se induce la regeneración ósea de regiones con daño por la enfermedad, reafirmando así el potencial como posible fármaco peptídico sintético (Salgado, 2017).

Resonancia Magnética Nuclear (RMN) como herramienta para la obtención de estructura tridimensional de biomoléculas.

El conocimiento de la conformación estructural de las proteínas y péptidos resulta en una herramienta de estudio de suma importancia para dilucidar el funcionamiento y participación en actividades biológicas de estas. La caracterización estructural ayuda a comprender los mecanismos fisiológicos que podrían desencadenar o promover proteínas y péptidos, en la actualidad el principal método de caracterización estructural de una biomolécula es por el método de difracción de rayos X, con el cual se obtiene un patrón de difracción, mediante el empleo de softwares especializados se puede obtener el modelo tridimensional. A pesar de esto, no es el único método de obtención de estructura tridimensional de biomoléculas, pues del total de estructuras reportadas en el PDB un 88.81% corresponde a estructuras resueltas por difracción de rayos X, el 7.89 % a Resonancia Magnética Nuclear (RMN), un 3.17% a Microscopía de electrones y el porcentaje restante a métodos combinados. (<https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-released-structures>).

Actualmente el empleo de RMN como técnica para resolver estructuras proteicas va al alza, pues en el último año (2020) el total de estructuras resueltas por esta técnica correspondía a un 7.89%. (<http://www.rcsb.org/stats>) esto está relacionado con ciertas ventajas que esta técnica puede tener, ya que a diferencia de la difracción de rayos X y la criomicroscopía, no se requieren conocer condiciones del medio para que la biomolécula se quede estática, teniendo así la posibilidad de poder analizar proteínas y péptidos en solución, lo que genera dinamismo en el modelo, alta resolución y fácil accesibilidad a este, además, permite el estudio detallado de la estructura electrónica de las moléculas (Wutrich, 2001). Todo lo antes mencionado nos lleva a pensar que debido a las ventajas que ha demostrado tener la técnica espectroscópica de RMN para la obtención y análisis de biomoléculas a resolución atómica estén generando un nuevo pensamiento en decidir la alternativa para obtener información relacionada a estructura.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La investigación a través de los años ha demostrado histológicamente que el cemento radicular es un tejido único, mientras que los estudios de las proteínas expresadas por las células que secretan el cemento radicular (cementoblastos) han identificado dos proteínas cemento específicas: HACD1/CAP y CEMP1. La información estructural de dichas proteínas es muy limitada y no se cuentan con modelos tridimensionales experimentales de ellas o de sus regiones funcionales, por lo cual se dificulta la comprensión de su actividad biológica y como contribuyen a la formación y mantenimiento del cemento radicular.

En la actualidad se ha identificado una región peptídica de CEMP1 que mimetiza la función biológica de la proteína completa (recombinante). Dicho péptido ha demostrado su importancia biotecnológica al revertir el proceso de osteoporosis en un modelo murino, mejorando la densidad mineral ósea de los animales con la enfermedad.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se tiene identificado un péptido que posee función biológica que mimetiza a la proteína recombinante hrCEMP-1. Este péptido (pCEMP1) ha demostrado tener actividad biológica mineralizante en un modelo murino con osteoporosis inducida, en el cual mejora la densidad ósea de los animales con la enfermedad.

El uso de pCEMP1 permite tener a disposición una biomolécula sintética biofuncional de fácil obtención que no depende de tecnología de expresión recombinante y por ende de sus desventajas (alto coste, bajo rendimiento, dificultad de purificación homogénea). Además, los antecedentes de estudios de pCEMP1 indican que el potencial biotecnológico clínico asociado a biomineralización requiere un estudio a profundidad del mecanismo de acción biológico a nivel molecular, por lo tanto, la información requerida para dichos estudios (estructura tridimensional) que ayuden a dilucidar la actividad de este péptido son vitales para estudios y aplicaciones clínicas (regeneración ósea y terapias periodontales) de esta biomolécula a corto, mediano y largo plazo.

HIPÓTESIS

La caracterización estructural de pCEMP-1 permitirá comprender el mecanismo de acción biológica del péptido asociada al proceso de formación de hidroxiapatita y su afinidad a este mineral.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Generar información estructural del péptido (estructura secundaria, terciaria y cuaternaria) y resolver los mecanismos de interacción molecular asociados a biomineralización (formación de hidroxiapatita).

Objetivos Específicos:

- Obtención de la molécula por Síntesis de Fase Sólida Fmoc y análisis de pureza por espectrometría de masas.
- Realizar la caracterización de niveles de organización de estructura secundaria: Obtención de espectros de Dicroísmo Circular).
- Realizar estudios de estructura terciaria de pCEMP1: Generación del modelo tridimensional de pCEMP1 por RMN (Obtención de espectros unidimensionales y bidimensionales, asignación de señales, construcción, validación y depósito del modelo 3D en el PDB).
- Realizar estudios de estructura cuaternaria de pCEMP1: Elaboración de experimentos de análisis de interacción intermolecular de pCEMP1 mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y experimentos computacionales de interacción molecular en biomineralización con el modelo experimental 3D de pCEMP1 (experimentos *in silico* del modelo 3D de pCEMP1 en interacción con hidroxiapatita).
- Realizar estudios sobre el mecanismo de acción de pCEMP1: Pruebas de actividad biológica *in vitro* de pCEMP1 (crecimiento de cristales de hidroxiapatita inducidos con pCEMP1 y análisis de fluorescencia).

MATERIAL Y MÉTODOS

Síntesis del péptido bioactivo de la proteína del cemento 1 (CEMP-1)

El péptido se sintetizó mediante la técnica de fase sólida FMOC/tBu, para obtener un liofilizado con una pureza mayor al 95% (New England Peptide). El péptido fue purificado por cromatografía de fase reversa y la determinación de pureza de la molécula mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Obtención de espectro inicial de RMN de 1D del pCEMP1

Con la finalidad de conocer la conformación estructural por RMN pCEMP1 en solución Se realizó una dilución inicial de prueba de 3mg/ml de péptido en 90% H₂O con 10% de agua deuterada a 298°K con un equipo de RMN (Bruker Avance III de 500 MHz (equivalente a 11.7434 T (tesla)) con una sonda de 5mm con canales para ¹H, ¹³C y ¹⁵N.

Determinación de estructura secundaria. Adquisición de espectros de Dicroísmo Circular (DC) e inducción del plegamiento.

Como un requisito para la construcción del modelo 3D de pCEMP1 se llevó a cabo la obtención de espectros de DC y conocer cuál era el porcentaje de estructura secundaria del mismo y mediante el empleo de diversos aditivos, encontrar condiciones de estabilidad de plegamiento. Para este fin el contenido de estructura secundaria se obtuvo mediante la técnica de Dicroísmo Circular (D.C) en el espectro de luz UV lejano (190-260nm). La muestra de pCEMP1 1mg/ml se diluyó en 100 y 200mM de CaCl₂ y en diversos porcentajes de 2, 2, 2-Trifluoroetanol (TFE) (Chem Cruz) para observar la inducción del plegamiento de pCEMP1. El espectro de dicroísmo se obtuvo en un espectropolarímetro Chirascan (Applied Photophysics), empleando una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico. El espectro final fue el promedio de cinco acumulaciones individuales realizadas cada nanómetro a una velocidad de barrido de 20 nm/min.

Adquisición de espectros bidimensionales TOCSY (TOtal Corelation Spectroscopy)

Para la obtención de espectros TOCSY y conocer la correlación de átomos de hidrogeno de cada aminoácido que conforma a pCEMP1 se preparó una dilución de 3mg/ml de péptido en 50% de TFED₂ y 50% de H₂O con 3% D₂O en un volumen total de 200µl, el deuterio se empleó para hacer una compensación electrónica y a su vez monitorear la homogeneidad del campo magnético aplicado. Se empleó un equipo de RMN, Bruker Advance 700 MHz (equivalente a 16.44 T (tesla)), se usaron gradientes en Z de 300.000 µsec. La solución del péptido se colocó dentro de la sonda para adquirir los espectros TOCSY de RMN.

Asignación de sistemas de spin

Los resultados experimentales obtenidos por RMN se procesaron con el software NMRPIPE. CARA 1.5 (Computer Aided Resonance Assignment) se usó para realizar el peak peaking (pp) e identificar y asignar sistemas de spin.

Adquisición de espectros NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy/ Espectro de Efecto Overhauser Nuclear).

El experimento NOESY es una herramienta de suma importancia en la identificación estereoquímica de una molécula en un disolvente.

La muestra seca del péptido CEMP-1 (3 mg) se disolvió en 50% de agua desionizada con Trifluoroetanol al 50% TFED₂ (Cambridge Isotopes Laboratories, Tewksbury, MA, EE. UU.) Y 3.0% D₂O v / v (Cambridge Isotopes Laboratories, Tewksbury, MA, EE. UU.), teniendo así un volumen total de 200µl. Los experimentos se realizaron en un espectrómetro de 700 MHz, en una sonda de 5,0 mm. Los espectros NOESY (tiempo de mezcla de 150 y 300 ms) se adquirieron en un Bruker Avance de 700 MHz (Bruker Biospin, Billerica, MA, US). La señal del agua fue suprimida con Double Pulsed Field Gradient Spin Echo (DPFGSE).

Asignación de secuencia de aminoácidos y determinación de distancias interatómicas

Los resultados experimentales obtenidos por RMN se procesaron con el software NMRPIPE. CARA 1.5 (Computer Aided Resonance Assignment) se usó para selección de pico y asignación de señal NOE. correspondientes a cada núcleo de hidrogeno obtenido de los espectros de RMN y su asignación espacial.

Elaboración del modelo tridimensional

Cálculo estructural

Los cálculos estructurales se realizaron con CYANA 2.1 (combined assignment and dynamics algorithm for NMR applications). Para la elaboración del modelo del péptido de CEMP1 (pCEMP1) se empleó un número de 20 estructuras de 200 que contaran con valores de energía bajos y que no presentaran violaciones en posiciones atómicas. Aunado a esto, se realizó un ajuste del modelo obtenido por dinámica molecular con el software AMBER 9 (Case, 2005).

Validación del modelo tridimensional y depósito en el PDB

Se realizó el reporte de validación de estructura del péptido mediante RMN para su posterior depósito, siguiendo los puntos establecidos por el PDB.

<https://www.wwpdb.org/validation/2017/NMRValidationReportHelp>

User guide to the wwPDB NMR validation reports

- 1. Overall quality at a glance
- 2. Ensemble composition and analysis
- 3. Entry composition
- 4. Residue-property plots
- 5. Refinement protocol and experimental data overview
- 6. Model quality
 - 6.1. Standard geometry
 - 6.2. Too-close contacts
 - 6.3. Torsion angles
 - 6.4 ⇒ 6.7. Non-standard residues in protein, DNA, RNA chains; Carbohydrates; Ligand geometry; Other polymers
 - 6.8. Polymer linkage issues
- 7. Chemical shifts validation

- 7.X.1. Bookkeeping
- 7.X.2. Chemical shift referencing
- 7.X.3. Completeness of the chemical shifts assignment
- 7.X.4. Statistically unusual chemical shifts
- 7.X.5. Random Coil Index (RCI) plots

Análisis *in silico* del modelo 3D

Análisis de simulaciones *in silico* de interacción entre moléculas (pCEMP1 e Hidroxiapatita)

Se empleó el software PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) y el software UCSF Chimera (Gasteiger *et al*, 2005; Zhang, 2008) para hacer análisis de estructura y asociación intermolecular. Con el servidor informático I-TASSER se realizó la construcción de modelos teóricos de pCEMP1 y de hrCEMP-1 para hacer análisis comparativos con los modelos experimentales.

Actividad biológica de pCEMP1. Formación de cristales de hidroxiapatita

Se utilizó el sistema de contradifusión en gel de silicato para formar cristales hidroxiapatita inducidos con pCEMP1. Este sistema consiste en el empleo de dos vidrios de 7 cm x 9 cm x 3mm, los cuales llevan entre ellos un marco de neopreno y 6 pinzas metálicas para fijar los componentes y evitar fugas. Dentro del sistema se forma un gel compuesto de 2 ml de metasilicato de sodio 1.06 gr/ml, 2 ml de HEPES 10mM pH 7.4 y 1.08 ml de H₃PO₄. En la parte superior del sistema se colocan 5 ml de la solución de difusión, la cual está compuesta de 200 mM de cloruro de calcio preparado en amortiguador de HEPES 10mM, pH 7.4. En el interior del gel de silicato de sodio se adiciona pCEMP1 a una concentración de 20 ug/ml. Las pruebas se incubaron durante un periodo de 7 días a 37°C. Transcurrido el periodo de tiempo para la formación de los cristales, éstos se recuperaron del gel de silicato y fueron almacenados para su posterior procesamiento y análisis con microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar su morfología tridimensional, hacer su caracterización y determinación de su fase cristalina (Hidroxiapatita) para posteriormente emplearlos en experimentos de interacción pCEMP1 – Hidroxiapatita.

Caracterización de cristales inducidos con pCEMP1

Los cristales formados en el sistema de contradifusión en gel de silicato fueron estudiadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para conocer microestructura, un análisis de energía dispersiva de rayos X (EDS) para determinar su composición elemental y radio calcio / fósforo (Ca/P) para determinar su grado de mineralización empleando un microscopio electrónico de barrido (SEM) Jeol 5600 con una fuente de electrones de filamento de tungsteno (Jeol MA, EE. UU.) y el sistema de microanálisis de energía dispersiva de rayos X Oxford Inca Energy 200, para el mapeo elemental de la muestra. y su determinación composicional cualitativa y cuantitativa, para elementos entre Be y U.

Además, se realizó un análisis de Microscopía Electrónica de Transmisión de alta resolución (HRTEM). Se utilizó un microscopio JEOL JEM-2010, con un cañón Termoiónico LaB6, a un voltaje de aceleración de 200 kV. Se determinó la distancia interplanar a partir de la transformada rápida de Fourier y con ayuda del software Gatan Digital Micrograph se midieron las distancias interplanares para corroborar la fase cristalina de las estructuras analizadas.

Pruebas de afinidad de pCEMP 1 a Hidroxiapatita.

Debido a reportes sobre la afinidad de CEMP1 a la hidroxiapatita (Romo *et al*, 2016) y demostrar la capacidad de pCEMP1 para la inducción, reclutamiento de iones y crecimiento de estructuras mineralizadas, se realizó una interacción entre pCEMP1 con esferoides de hidroxiapatita formados en el sistema de contradifusión de gel de silicato, con la finalidad de comprobar que el péptido tiene la capacidad de adsorberse en superficies de hidroxiapatita. Los esferoides de hidroxiapatita se colocaron en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml con una solución de pCEMP1 a una concentración de 1 mg/uL con un volumen total de 400 µL. Esta concentración se reafirmó mediante la toma de una muestra de la solución y cuantificado por el método de Bradford a 595 nm. Los cristales se incubaron en la solución a 37°C durante 48 horas para promover la interacción péptido hidroxiapatita y verificar si pCEMP1 tiene afinidad a hidroxiapatita. Como control los cristales de hidroxiapatita se colocaron en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml con un volumen total de 400 µL de agua.

Análisis del crecimiento de los cristales de Hidroxiapatita con pCEMP1 adsorbido en superficie como reclutador de Calcio

Los cristales con pCEMP1 adsorbido en la superficie fueron colocados en un medio con calcio para observar mediante fluorescencia si los cristales aumentaban su cantidad de calcio en superficie derivado de la hipótesis que menciona a pCEMP1 como reclutador de calcio. Se analizó la capacidad de aumento de la emisión de luminiscencia en los cristales de HA mediante el empleo del reactivo Fluo-4 AM (Thermo Fisher), el cual tiene la característica de asociarse al calcio activado o involucrado en procesos de intercambio iónico, esto se traducirá como un aumento en la señal de fluorescencia (Ex/Em 494/506 nm). Las lecturas de la emisión de fluorescencia se realizaron con un lector de ELISA (Cytation™ 1 Cell Imaging Multi-Mode Reader). Se tomó un esferoide de hidroxiapatita incubado en la solución de pCEMP1 a 37°C durante 48 horas y se colocó en una placa de fondo cóncavo de 96 pozos, con una solución de 300µl de Cloruro de Calcio (CaCl_2) a una concentración de 500mM, al pozo que contenía el esferoide de hidroxiapatita con CaCl_2 500mM se le añadió 5µl del reactivo Fluo-4 AM (Thermo Fisher). Para el control se colocó un esferoide incubado en agua, se le agregaron 300µl de Cloruro de Calcio (CaCl_2) a una concentración de 500mM, al pozo que contenía el esferoide de hidroxiapatita incubado en agua con CaCl_2 500mM se le añadió 5µl del reactivo Fluo-4 AM. Se tomaron imágenes y midiendo la emisión de fluorescencia cada 15 durante 3 horas para posteriormente hacer un análisis cualitativo y comparativo del grupo experimental con el control para determinar si la emisión de fluorescencia aumentaba y comprobar así la afinidad del péptido a la hidroxiapatita y su capacidad de reclutar calcio a estructuras minerales.

Comportamiento de oligomerización/monodispersidad en solución de pCEMP1

Para conocer el comportamiento de pCEMP1 en solución y su interacción molécula-molécula, la cual puede tener influencia en la formación de estructuras que tengan la capacidad de interactuar con superficies de HA y iones minerales que promuevan la biomineralización, se llevó a cabo el estudio de dispersión dinámica de luz. Este estudio se elaboró con un equipo de Dispersión Dinámica de Luz “Zetasizer Nano” (Malvern Co) y el programa informático Zetasizer Family Vol 7 para la visualización y el análisis de los datos. Para el estudio se emplearon 400 µL de pCEMP1 a una concentración de 0.75 mg/ml resuspendido en amortiguador de fosfato de sodio 10mM pH 6.8. Se emplearon 3 temperaturas diferentes, 32, 37 y 42 °C y diez lecturas para cada una.

Análisis experimental *del* modelo 3D de pCEMP1 y explicación del mecanismo de acción en la formación de cristales de Hidroxiapatita

Se empleó el software PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) y el software UCSF Chimera (Gasteiger *et al*, 2005; Zhang, 2008) para hacer análisis de estructura y asociación intermolecular, formación de complejos peptídicos que pudieran explicar la formación de estructuras iniciadoras de la biomineralización, reclutamiento de iones minerales y direccionamiento del crecimiento cristalino.

RESULTADOS

Síntesis del péptido bioactivo de la proteína del cemento 1 (pCEMP-1) y obtención de espectros iniciales de Dicroísmo Circular y RMN 1D.

El péptido se sintetizó por la técnica de fase sólida Fmoc/tBu por la empresa New England Peptide, posteriormente se purificó mediante cromatografía HPLC (High performance liquid chromatography/cromatografía líquida de alta eficacia) para obtener un liofilizado con una pureza mayor al 95%, el cual fue analizado por espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight/desorción/ionización láser asistida por matriz- Tiempo de vuelo). El análisis de cromatografía de fase reversa (imagen 1) y espectrometría de masas (Imagen 2) de pCEMP1 indican que no se encuentran otras moléculas que sean diferentes a pCEMP1 en el liofilizado (Imagen 1). El péptido obtenido corresponde a los 20 primeros aminoácidos del extremo amino terminal de la secuencia de la proteína CEMP-1 (**MGTSSTDSQQAGHRCSTSN**).

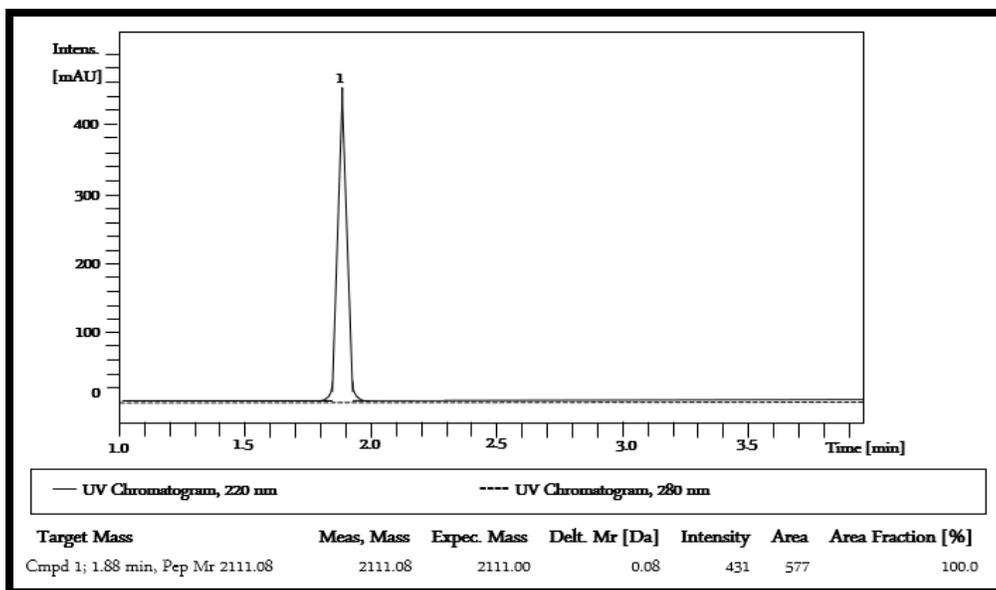


Imagen 1. HPLC, Cromatograma de la purificación del péptido CEMP-1. En esta purificación se observa solamente un pico en el cromatograma, el cual corresponde al 100% de la fracción retenida. La medida de la masa es de 2,111.08 Da, muy próximo a la masa calculada (2,111.00) <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>. Los datos indican que esta fue una purificación con un solo elemento que se ha podido aislar, en este caso pCEMP1.

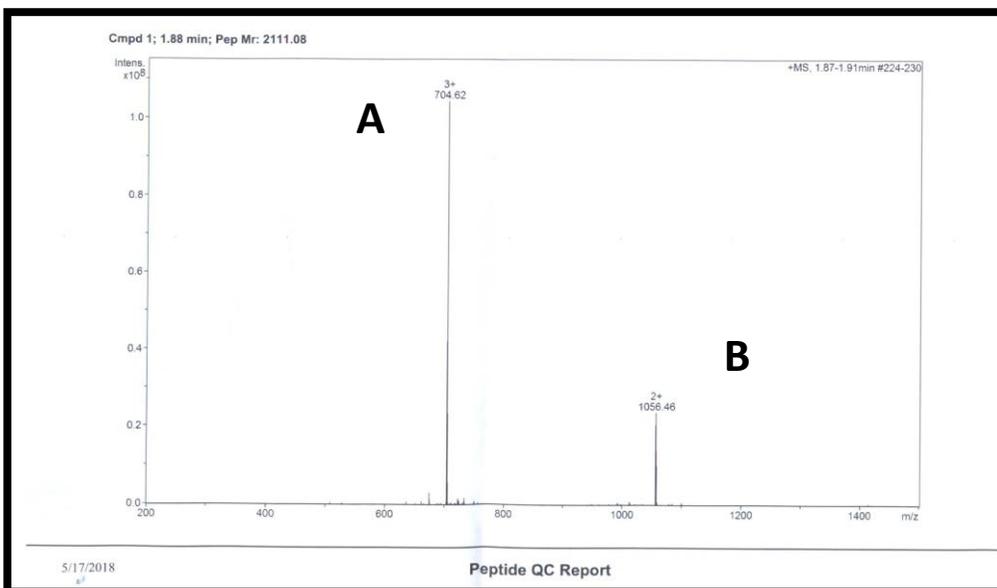


Imagen 2. Espectro de masas del péptido de CEMP-1. Pueden observarse en el espectro dos picos (A y B). A Corresponde a una molécula de *Mr* de 704.62 kDa 3+ expresada en kDa como 2,113.86 kDa. B Corresponde a una molécula de *Mr* de 1056.46 kDa 2+ expresada en kDa como 2,112.92kDa. A y B corresponden al MW teórico de pCEMP1 (MGTSTSDSQQ AGHRRRCSTSN). <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>

Quality Control Specifications:		
QC Test	QC Specifications	Results
Purity by HPLC	>95% by percent area	Pass
Mass Identification by Mass Spectral Analysis	Calculated Mass within 0.1% of Molecular Weight: 2111	Pass
Concentration/ Net Peptide	Amino Acid Analysis (AAA) determining original concentration/net peptide content.	N/A

Imagen 3. Especificaciones de pureza del producto obtenido (pCEMP-1). Purificación por HPLC a un 95% de pureza (Aprobado). Identificación de masa molecular por espectroscopía MALDI-TOF con peso molecular de 2,1111.00 Da (Aprobado).

Un requisito de importancia para poder realizar un modelo tridimensional de una biomolécula por RMN es determinar si es posible obtener de esta un espectro 1D de RMN, ya que es posible que ciertas biomoléculas no presenten esta característica. Se comenzó el análisis de resonancia magnética nuclear monodimensional del péptido, esto con la finalidad de obtener señales FID (Free Induction Decay) que pudieran convertirse mediante transformada de Fourier a un espectro de RMN de 1D. El resultado esperado era obtener señales FID producidas a partir de la aplicación de campos magnéticos a los núcleos de hidrógeno de la muestra y relajación de estos en relación con el tiempo, característico de moléculas que presentan interacción entre sí y que podrían inferir la presencia de estructura. Como resultado inicial se obtuvo la FID de la muestra de pCEMP1 y su conversión a espectro de RMN 1D (Imagen 4). Con el espectro de RMN 1D se pueden apreciar múltiples picos con diversos desplazamientos químicos, característicos de determinados grupos funcionales que conforman al péptido.

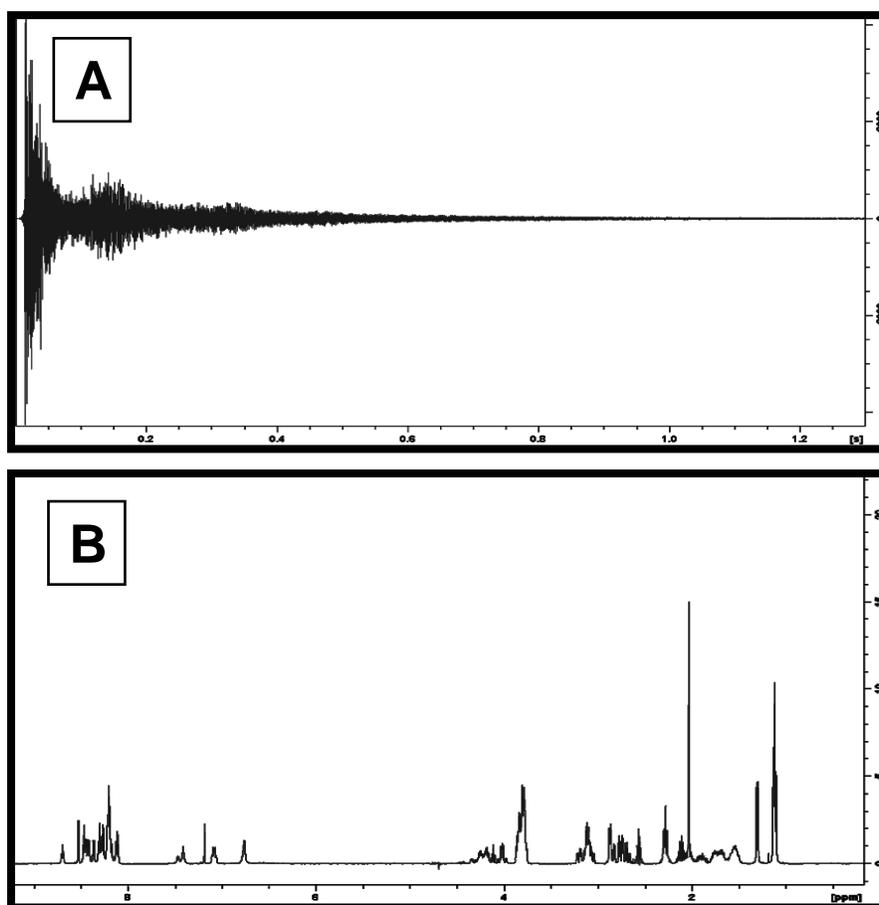


Imagen 4. A) Espectro FID y B) Espectro de RMN 1D de pCEMP1.

Estudio de estructura secundaria de pCEMP1 y análisis de espectros de Dicroísmo Circular (D. C).

Previamente a la elaboración de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se analizó el péptido en soluciones, PO_4 20mM, ClCa_2 200mM y Trifluoroetanol (TFE) al 10, 20, 30, 40 y 50%, para conocer el comportamiento de estos aditivos en el medio y observar si se promovía la formación de estructura secundaria del péptido. El contenido de estructura secundaria fue determinado mediante Dicroísmo Circular (D.C.) en el espectro de luz UV lejano (190-260nm). Los resultados indicaron que pCEMP1 no presenta estructura secundaria cuando se encuentra en una solución con PO_4 20mM como aditivo (Imagen 5A) así como en sistemas con alta carga iónica como lo son aquellos con altas concentraciones de ClCa_2 (200mM) (Imagen 5B).

Sin embargo, a una concentración de 50% de TFE se obtienen espectros de DC muy característicos de una proteína con estructura secundaria. En este espectro de dicroísmo circular se observó un perfil característico de proteínas enriquecidas en hélices alfa con valores máximos negativos en 208 - 222 nm y positiva entre 191 - 193 nm (Imagen 5C). El resultado de la deconvolución de los datos usando el algoritmo K2D fue de un porcentaje de un 48.2% de hélice alfa, 8.1% de Hoja beta y un 43.0% de random coil (Imagen 5C), presentando así un cambio significativo en comparación a las otras concentraciones de TFE probadas con el péptido (Imagen 6). Con estos resultados se decidió usar una concentración de TFE superior al 50% en la solución del péptido para obtener los espectros de RMN. Para este caso fue necesario usar Trifluoroetanol deuterado (2,2,2-Trifluoroetanol-D₂ o TFED₂) para que los Hidrógenos de esta molécula no interfirieran en la obtención de señales de RMN.

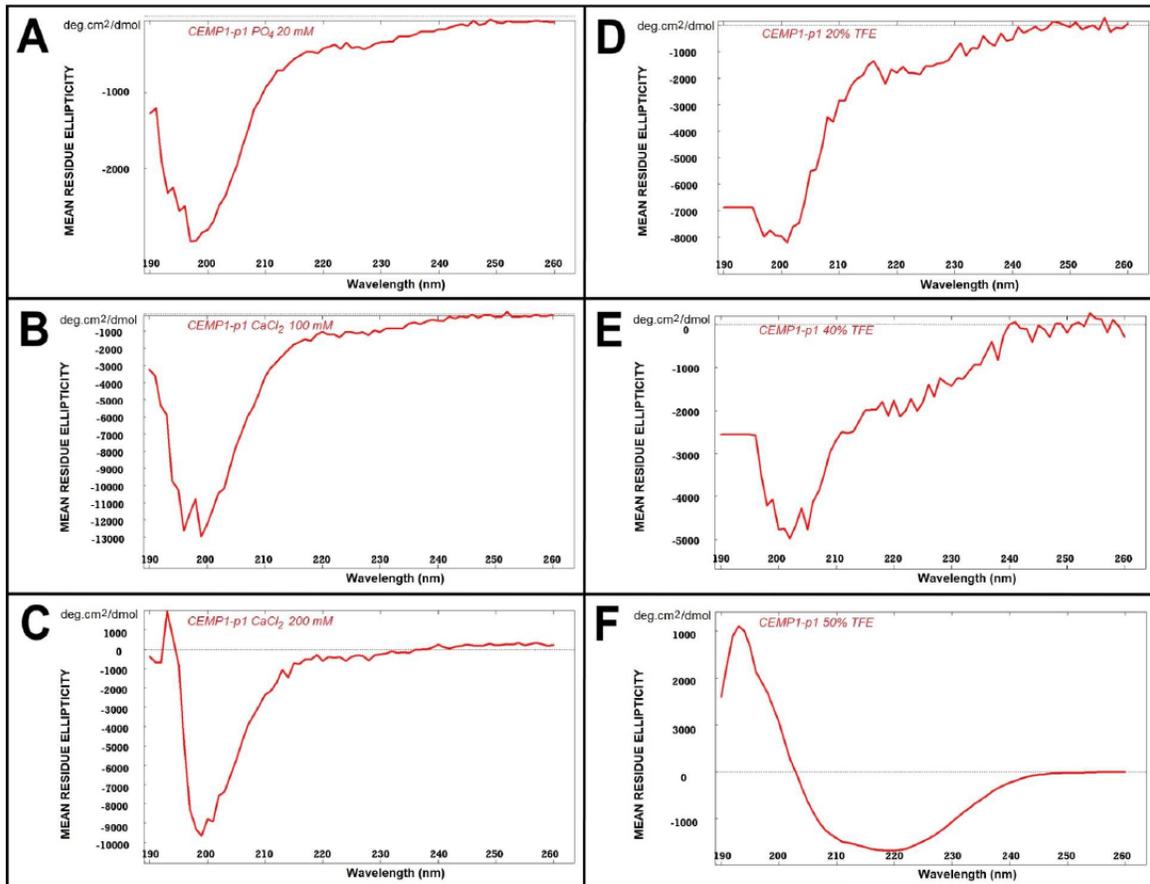


Imagen 5. A. Espectro de Dicroísmo Circular de pCEMP1 en solución de fosfato (PO_4) 20mM. B. Espectro de Dicroísmo Circular de pCEMP1 en CaCl_2 100mM. C. Espectro de Dicroísmo Circular de pCEMP1 en CaCl_2 200mM. D. Espectro de Dicroísmo Circular de pCEMP1 con 20% de TFE. E. Espectro de Dicroísmo Circular de pCEMP1 con 40% de TFE. En A, B, C, D y E puede observarse características en el espectro de moléculas que no se encuentran plegadas en solución. F. Espectro de Dicroísmo Circular de pCEMP1 con 50% de TFE. Se observa un espectro de estructura predominante de alfa hélice en su contenido, con máximos negativos en el rango de 208 y 220 nm. Deconvolución de datos empleando el algoritmo K2D.

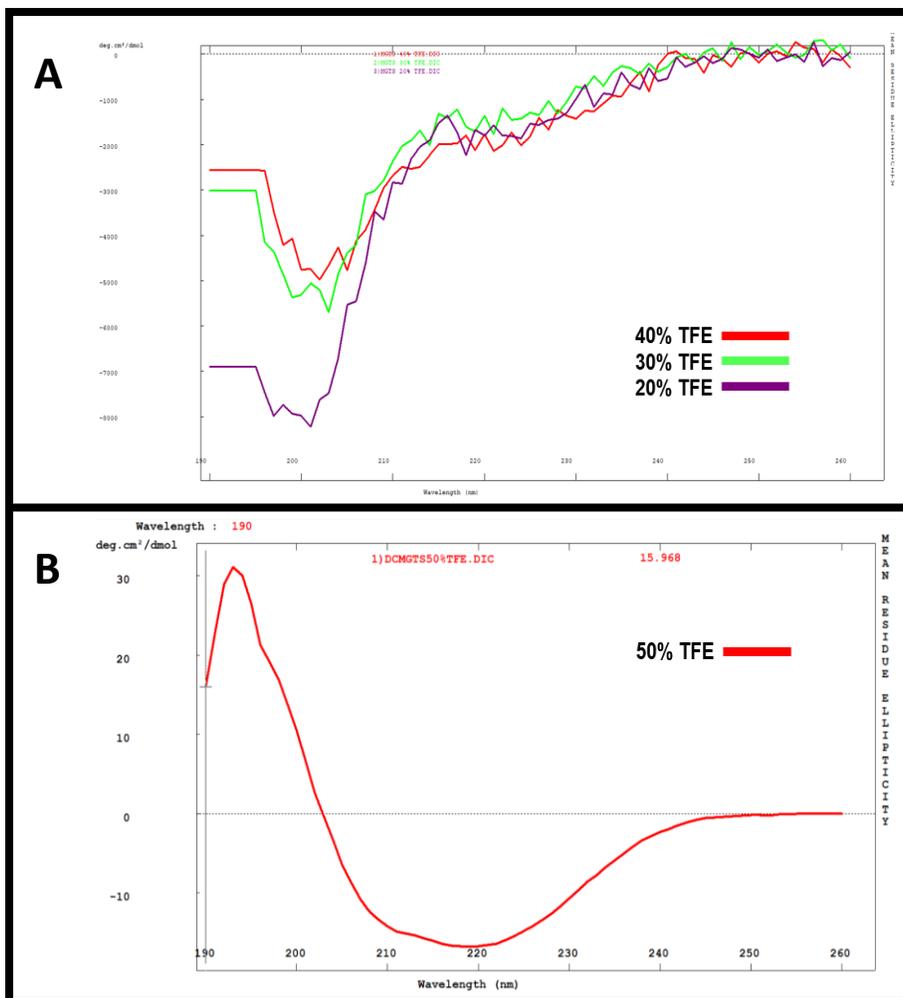


Imagen 6. A. Espectro de Dicroísmo Circular de pCEMP1 con 20%, 30 y 40% de TFE. Se observan espectros de moléculas en solución sin plegamiento, a diferencia de B en el cual se muestra un espectro de Dicroísmo Circular de pCEMP1 con 50% de TFE, puede observarse un espectro de estructura predominante de alfa hélice en su contenido, con máximos negativos en el rango de 208 y 220 nm. Deconvolución de datos empleando el algoritmo K2D.

Estudio de estructura terciaria de pCEMP1 (Construcción del modelo tridimensional de pCEMP1)

Adquisición de espectros 1D de RMN.

Se comenzó el análisis de resonancia magnética nuclear unidimensional del péptido, esto con la finalidad de obtener señales FID (Free Induction Decay) que pudieran convertirse mediante transformada de Fourier a un espectro de RMN de 1D. El resultado esperado era obtener señales FID producidas a partir de la aplicación de campos magnéticos a los núcleos de hidrogeno de la muestra y relajación de estos en relación con el tiempo, característico de moléculas que presentan interacción entre sí y que podrían inferir la presencia de estructura. Se llevó a cabo la aplicación de campos magnéticos externos a la muestra con un equipo de RMN, Bruker Ascend 700 MHz (equivalente a 16.44 T (tesla)), teniendo como resultado inicial la FID de la muestra (Imagen 7) y su conversión a espectro de RMN 1D (Imagen 8). Es de suma importancia comenzar con este análisis debido a que no todas las biomoléculas podrían presentar este comportamiento, lo cual derivaría en descartar a la RMN como técnica ideal para obtener la estructura tridimensional de este péptido.

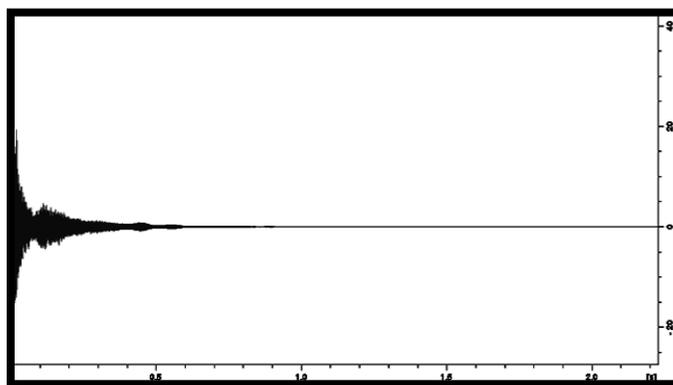


Imagen 7. Espectro FID de-pCEMP1.

Con el espectro de RMN 1D se pueden apreciar múltiples picos con diversos desplazamientos químicos, característicos de determinados grupos funcionales que conforman al péptido (Imagen 9), como pueden ser grupos amino, metilo, aldehídos entre otros, todo esto analizando el desplazamiento químico de la señal y si esta presenta dobletes o tripletes (patrones comunes de splitting). (Apéndice 1)

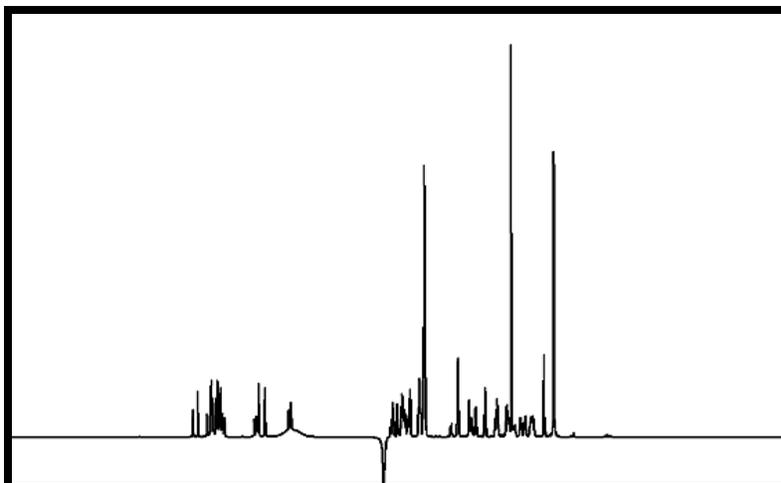


Imagen 8. Espectro de RMN 1D de-pCEMP1.

Adquisición de espectros bidimensionales TOCSY (TOtal Corelation SpectroscopY)

Como resultados se obtuvo un espectro monodimensional de ¹H que arrojó información del desplazamiento químico de los grupos funcionales.

Además, este experimento generó un espectro bidimensional homonuclear (Imagen 9, 10,11 y 12), el cual dio información de las relaciones entre los múltiples protones de la molécula analizada. Estas correlaciones corresponden a los sistemas de spin de cada aminoácido que conforma el péptido.

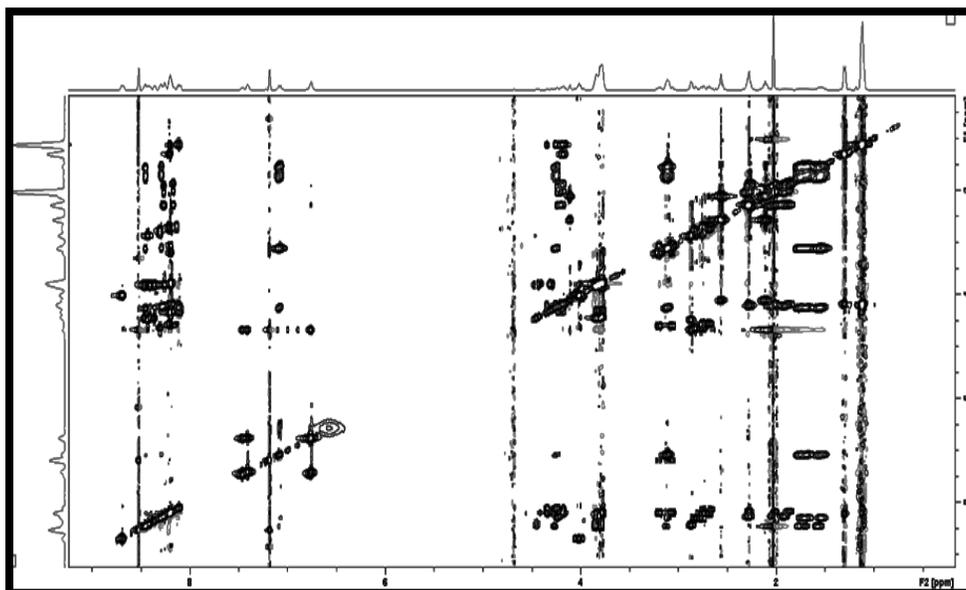


Imagen 9. Espectro de RMN homonuclear bidimensional TOCSY del péptido sintético. Análisis de espectros con el software TopSpin.

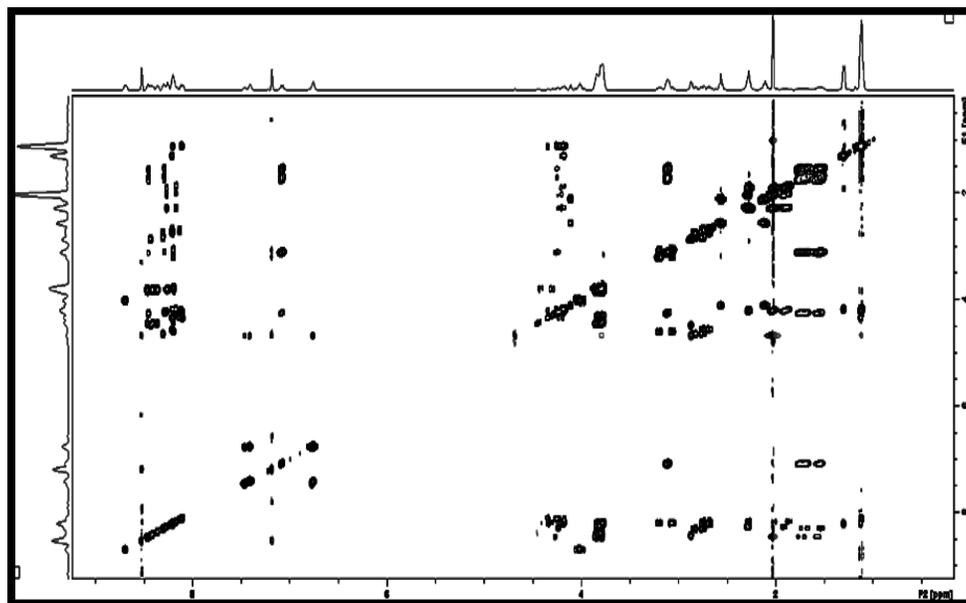


Imagen 10. Espectro de RMN homonuclear bidimensional TOCSY del péptido sintético. Análisis de espectros con el software TopSpin.

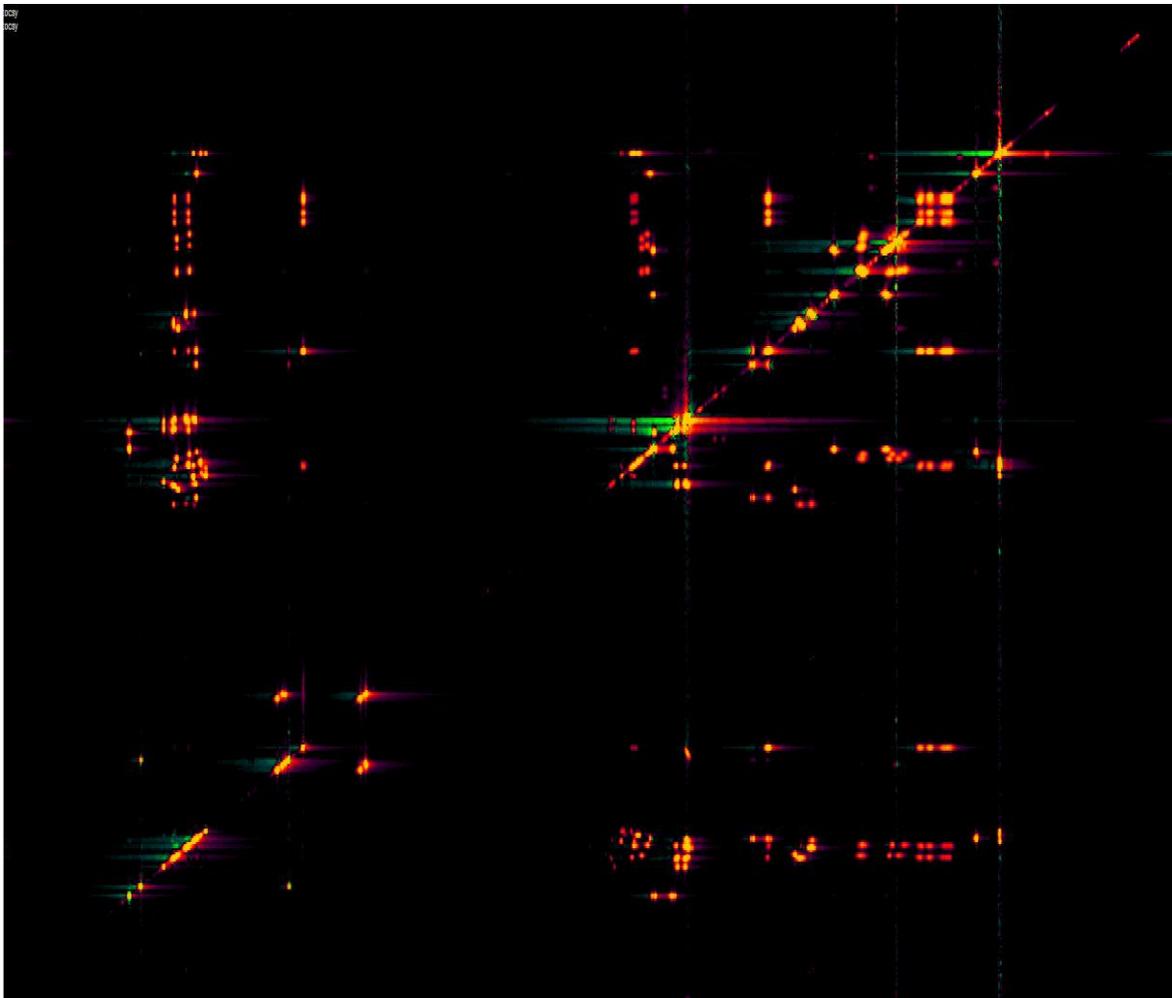


Imagen 11. Espectro de RMN homonuclear bidimensional TOCSY del péptido sintético. Análisis de espectros con el software CARA (Computer Aided Resonance Assignment).

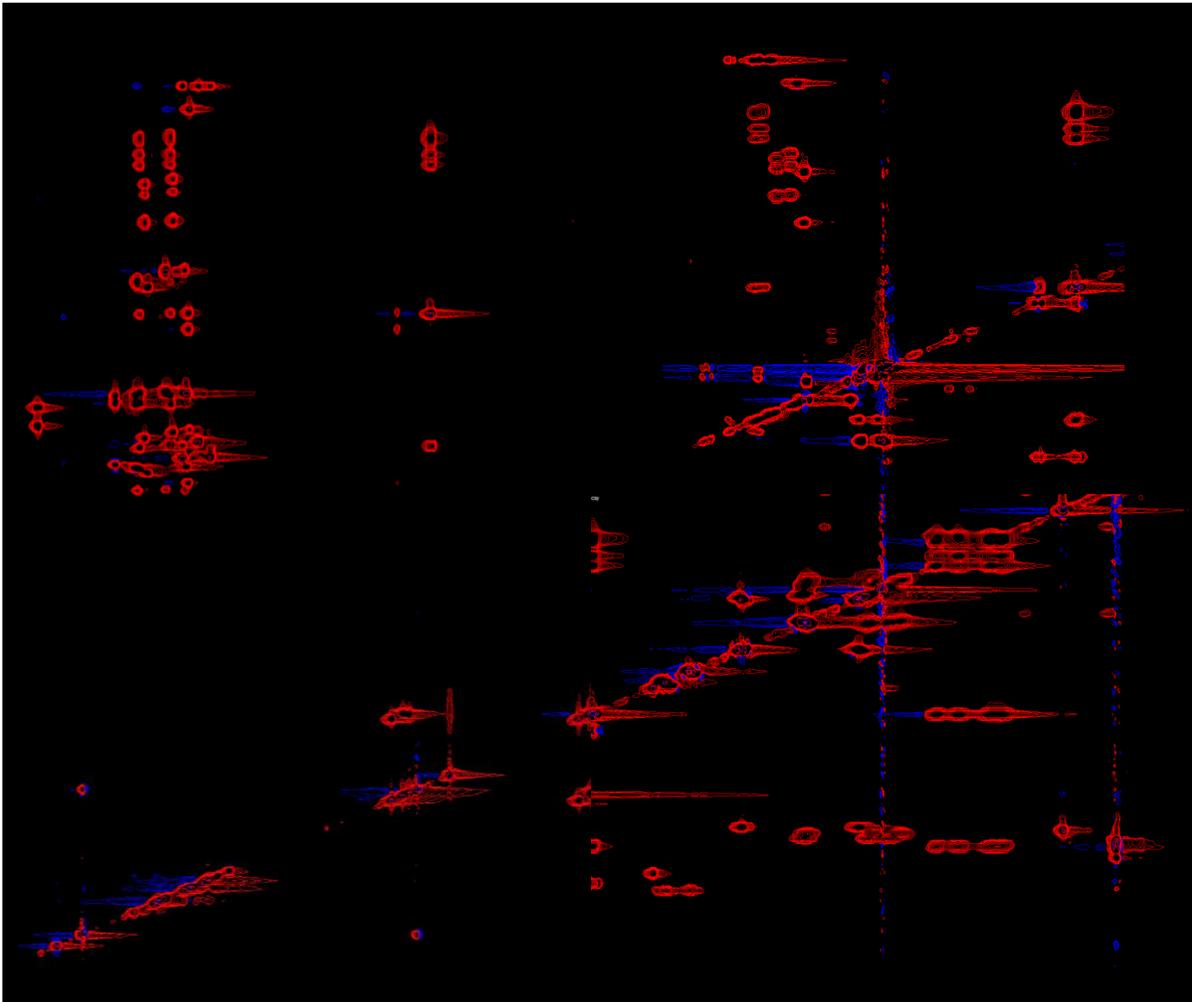


Imagen 12. Espectro de RMN homonuclear bidimensional TOCSY del péptido sintético. En esta serie de imágenes se muestra un acercamiento en diferentes cuadrantes del espectro 2D, en los cuales pueden observarse a detalle las señales producidas por los ^1H que conforman a cada Sistema de Spin de los aminoácidos que componen a pCEMP1. Análisis de espectros con el software CARA.

Con estos resultados se puede corroborar mediante asignación de señales la composición de pCEMP1, los aminoácidos que lo componen y posteriormente la correlación espacial que tienen entre sí, lo que lleva a la determinación de su estructura tridimensional.

Asignación de sistemas de spin

Mediante el empleo del software CARA (Computer Aided Resonance Assignment) se llevó a cabo la asignación de los sistemas de espín de los aminoácidos que componen al péptido (20 totales) para confirmar su presencia.

Este paso en la metodología inicia la creación de restricciones del modelo tridimensional, debido a que las señales de ^1H que correlacionan entre sí representan al sistema de spin de cada aminoácido y desplazamiento de protones que conforman a un aminoácido, teniendo así dos puntos, el primero de ellos es el cerciorarse de que pCEMP1 esté conformado realmente por los 20 aminoácidos (lo cual también se respalda por la espectrometría de masas) y también verificar si el comportamiento de estas correlaciones no son características de otro aminoácido. En este caso, se puede observar la asignación de los sistemas de spin de pCEMP 1 (Tabla 1 e Imágenes 13, 14 y 15), los cuales coinciden con tablas internacionales de sistemas de spin de aminoácidos (Tabla 2, Apéndice 1, 2 y 3).

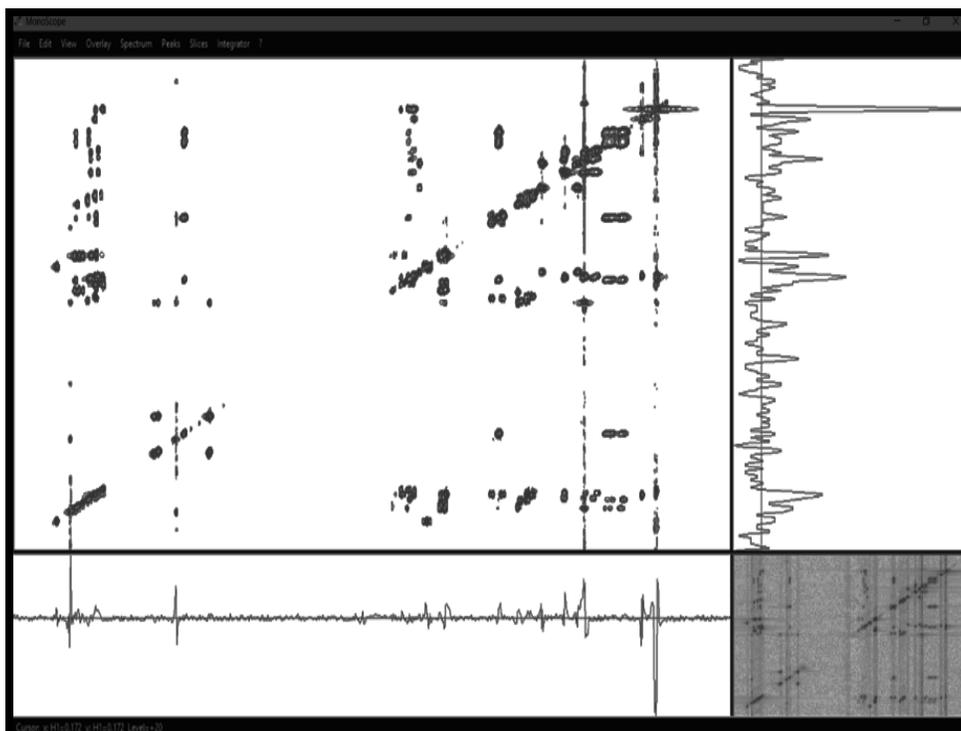


Imagen 13. Espectro de RMN homonuclear bidimensional TOCSY. Asignación de sistemas de spin en el software CARA

pCEMP1: M G T S S T D S Q Q A G H R R C S T S N				
Metionina (M) $\beta = 1.89$ $\gamma = 2.29$ $\alpha = 4.58$ NH = 8.21	Glicina (G) $\alpha = 3.07$ $\alpha = 3.19$ NH = 7.19	Treonina (T) $\gamma = 1.30$ $\beta = 4.19$ $\alpha = 4.34$ NH = 8.21	Serina (S) $\beta = 3.80$ $\beta' = 3.85$ $\alpha = 4.46$ NH = 8.46	Serina (S) $\beta = 3.80$ $\beta' = 3.85$ $\alpha = 4.45$ NH = 8.40
Treonina (T) $\gamma = 1.12$ $\beta = 4.18$ $\alpha = 4.25$ NH = 8.11	Ac. Aspártico (D) $\alpha = 4.69$ $\alpha = 6.76$ NH = 7.19	Serina (S) $\beta = 3.80$ $\beta' = 3.83$ $\alpha = 4.45$ NH = 8.36	Glutamina (Q) $\beta = 1.87$ $\beta' = 2.00$ $\gamma = 2.28$ $\alpha = 4.17$ NH = 8.17	Glutamina (Q) $\beta = 1.91$ $\beta' = 2.04$ $\gamma = 2.29$ $\alpha = 4.24$ NH = 8.27
Alanina (A) $\beta = 1.30$ $\alpha = 4.35$ NH = 8.10	Glicina (G) $\alpha = 4.04$ NH = 8.71	Histidina (H) $\beta = 4.69$ $\alpha = 6.78$ NH = 7.47	Arginina (R) $\gamma = 1.53$ $\beta = 1.70$ $\beta' = 1.76$ $\delta = 3.13$ $\alpha = 4.20$ NH = 8.45	Arginina (R) $\gamma = 1.54$ $\beta = 1.67$ $\beta' = 1.74$ $\delta = 3.11$ $\alpha = 4.24$ NH = 8.29
Cisteína (C) $\beta = 4.69$ $\alpha = 6.76$ NH = 7.41	Serina (S) $\beta = 3.83$ $\alpha = 4.19$ NH = 8.19	Treonina (T) $\gamma = 1.13$ $\beta = 3.78$ $\alpha = 4.61$ NH = 8.20	Serina (S) $\beta = 3.81$ $\alpha = 4.23$ NH = 8.26	Asparagina (N) $\alpha = 4.70$ NH = 6.50

Tabla 1. Sistemas de Spin Resueltos y Asignados de los aminoácidos que conforman a pCEMP1, se observan los rangos de desplazamiento químico de los protones α de ^1H así como el desplazamiento de los respectivos acoplamientos de protones β , β' , γ y δ al ^1H α de cada aminoácido de la secuencia del péptido analizado.

residue	NH	H α	H β	other
Ala	8.24	4.32	1.39	
Cys(red)	8.32	4.55	2.93, 2.93	
Cys(ox)	8.43	4.71	3.25, 2.99	
Asp	8.34	4.64	2.72, 2.65	
Glu	8.42	4.35	2.06, 1.96	γ CH ₂ 2.31, 2.31
Phe	8.30	4.62	3.14, 3.04	2,6H 7.28; 3,5H 7.38; 4H 7.32
Gly	8.33	3.96		
His	8.42	4.73	3.29, 3.16	2H 8.58; 4H 7.29
Ile	8.00	4.17	1.87	γ CH ₂ 1.45, 1.16; γ CH ₃ 0.91; δ CH ₃ 0.86
Lys	8.29	4.32	1.84, 1.75	γ CH ₂ 1.44, 1.44; δ CH ₂ 1.68, 1.68; ϵ CH ₂ 2.99, 2.99; ϵ NH ₃ ⁺ 7.81
Leu	8.16	4.34	1.62, 1.62	γ CH 1.59; δ CH ₃ 0.92, 0.87
Met	8.28	4.48	2.11, 2.01	γ CH ₂ 2.60, 2.54; ϵ CH ₃ 2.10
Asn	8.40	4.74	2.83, 2.75	γ NH ₂ 7.59, 6.91
Pro	-	4.42	2.29, 1.94	γ CH ₂ 2.02, 2.02; δ CH ₂ 3.63, 3.63
Gln	8.32	4.34	2.12, 1.99	γ CH ₂ 2.36, 2.36; δ NH ₂ 7.52, 6.85
Arg	8.23	4.34	1.86, 1.76	γ CH ₂ 1.63, 1.63; δ CH ₂ 3.20, 3.20; ϵ NH 8.07
Ser	8.31	4.47	3.89, 3.87	
Thr	8.15	4.35	4.24	γ CH ₃ 1.21
Val	8.03	4.12	2.08	γ CH ₃ 0.94, 0.93
Trp	8.25	4.66	3.29, 3.27	2H 7.27; 4H 7.65; 5H 7.18; 6H 7.25; 7H 7.50
Tyr	8.12	4.55	3.03, 2.98	2,6H 7.14; 3,5H 6.84

Tabla 2. Representación gráfica de los sistemas de spin. Pueden observarse los rangos de desplazamiento químico de los protones α de ^1H así como el desplazamiento de los respectivos acoplamientos de protones β , β^1 , γ y δ al ^1H α de cada aminoácido, los cuales son primordiales para determinar la identidad de cada aminoácido. (Cavanagh, 2006)

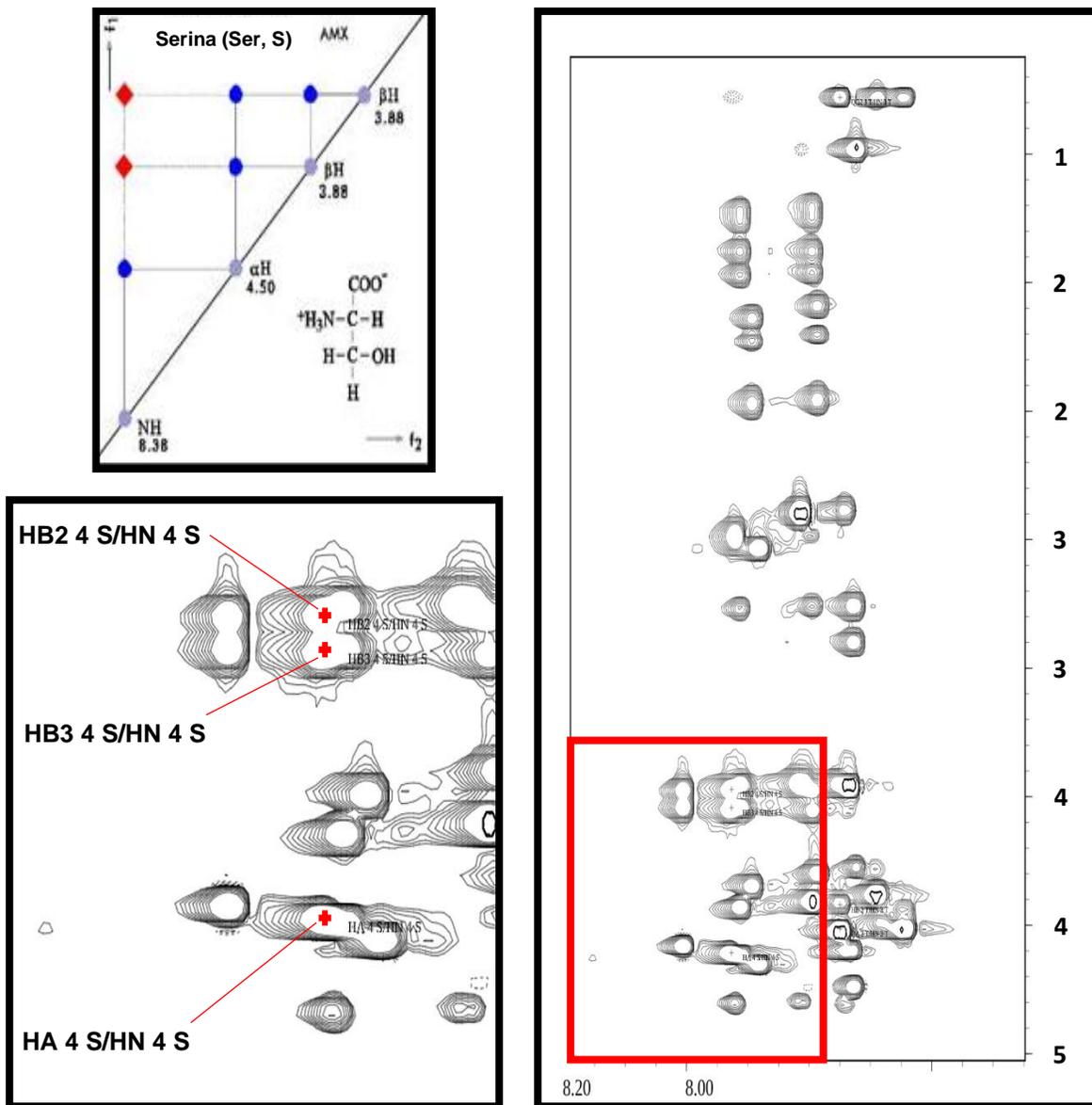


Imagen 14. Espectro de RMN bidimensional TOCSY de pCEMP1. Se muestran las señales pertenecientes al aminoácido Serina (Recuadro rojo y recuadro inferior izquierdo), el cual ocupa el lugar número 4 en la secuencia de aminoácidos del péptido. En el recuadro superior izquierdo se observan las señales y los desplazamientos químicos esperados para este sistema de spin.

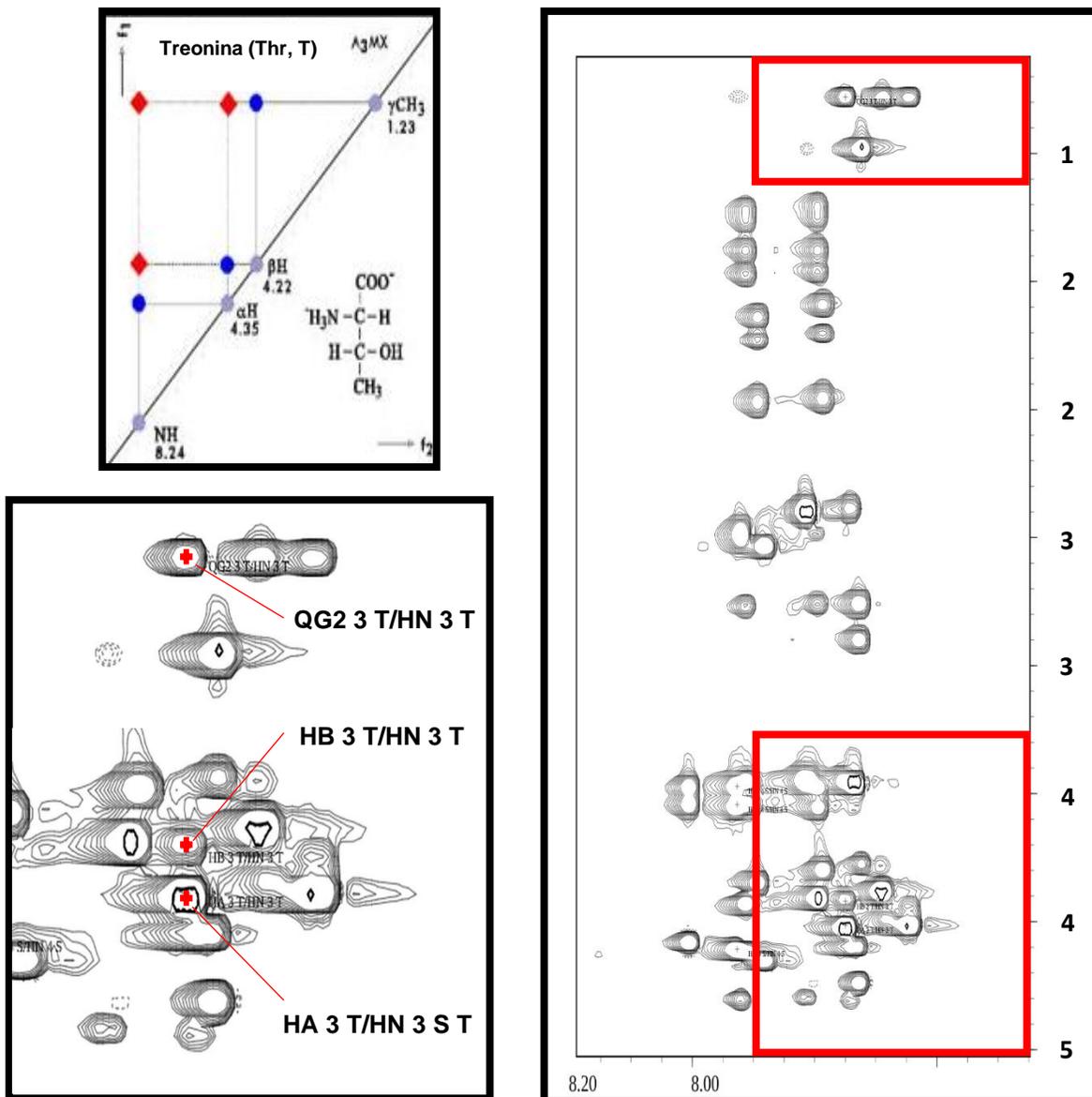


Imagen 15. Espectro de RMN bidimensional TOCSY de pCEMP1. Se muestran las señales pertenecientes al aminoácido Treonina (Recuadro rojo y recuadro inferior izquierdo), el cual ocupa el lugar número 3 en la secuencia de aminoácidos del péptido. En el recuadro superior izquierdo se observan las señales y los desplazamientos químicos esperados para este sistema de spin.

Adquisición de espectros NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy/ Espectro de Efecto Overhauser Nuclear), asignación de secuencia de aminoácidos y determinación de distancias interatómicas

El experimento NOESY es una herramienta de suma importancia en la identificación estereoquímica de una molécula en un disolvente, estos espectros homonucleares bidimensionales de H^1 tienen la finalidad de arrojar información relacionada con la correlación que tienen átomos de Hidrógeno de la molécula estudiada a través del espacio a menos de 5 Å de distancia. Esta correlación espacial se traduce como la interacción entre aminoácidos o, mejor dicho, la estructura tridimensional de la biomolécula.

Como resultado se obtuvieron correlaciones entre espectros monodimensionales de los átomos de hidrogeno que componen a los aminoácidos de pCEMP1 que se encuentran próximos entre sí, los cuales arrojan información del comportamiento de los aminoácidos y su interacción entre sí, logrando así poder determinar si existe la presencia de señales características de una molécula con plegamiento. Lo cual, equivale a múltiples picos diagonales, cruzados y axiales en el espectro (Imágenes 16, 17 y 18) y señales de entrecruzamiento (NOE) de los aminoácidos que conforman a pCEMP1 con proximidad espacial, traducida como plegamiento. (Imágenes 19 y 20. Apéndice 4)

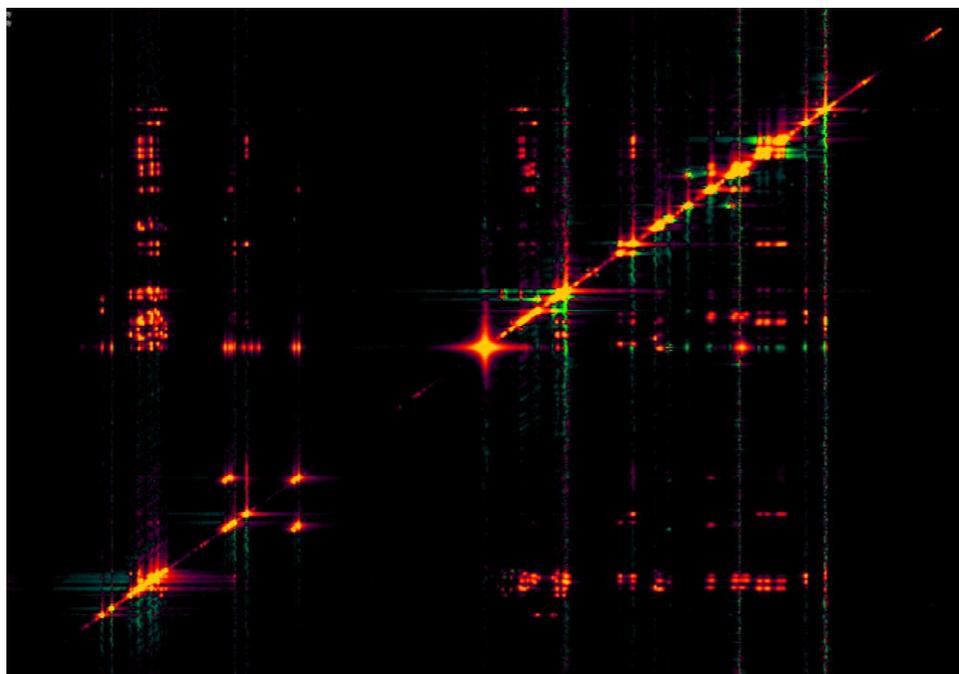


Imagen 16. Espectro de RMN homonuclear bidimensional NOESY de pCEMP1. Análisis de espectros con el software CARA

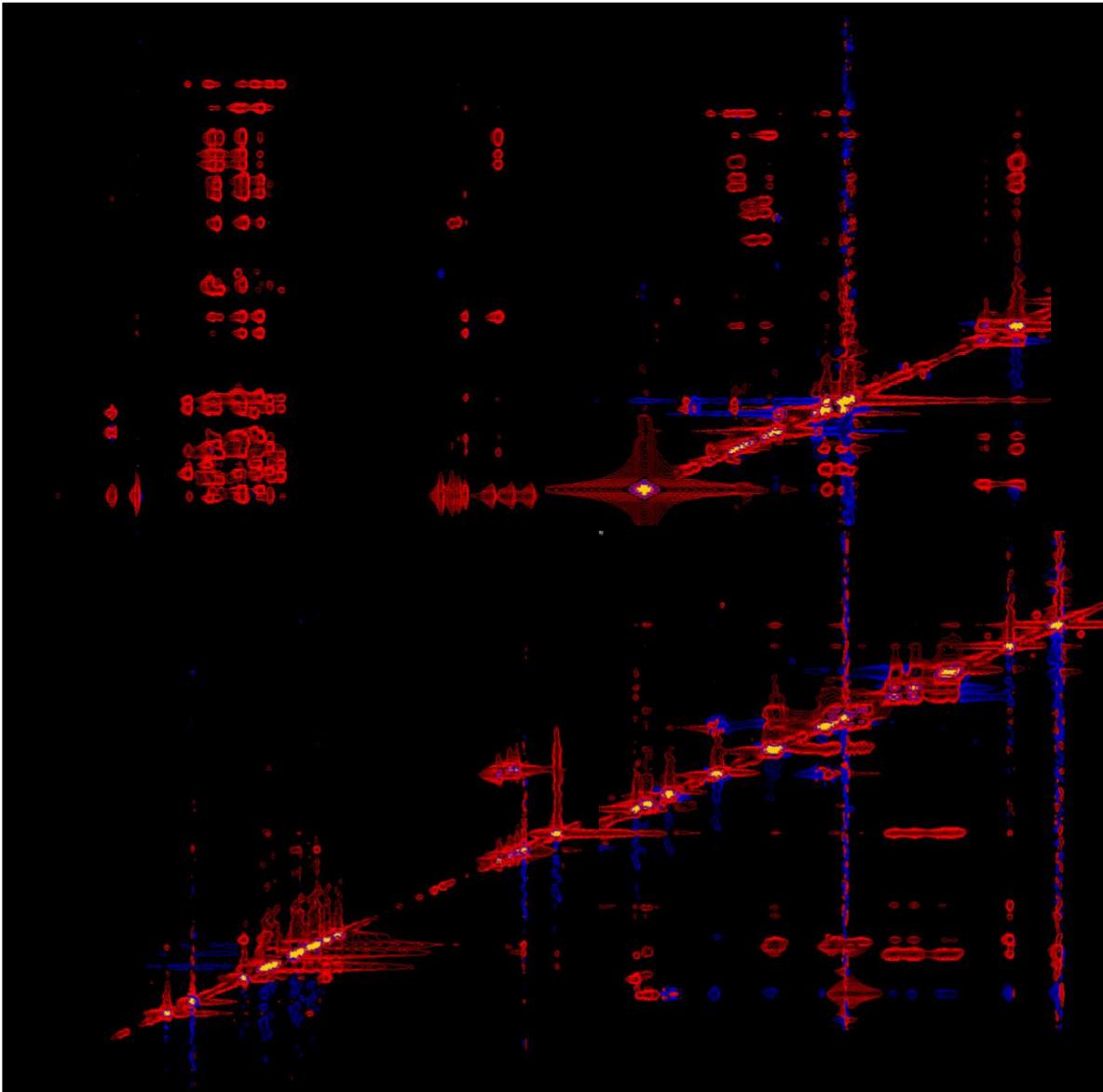


Imagen 17. Espectro de RMN homonuclear bidimensional NOESY del péptido sintético. En esta serie de imágenes se muestra un acercamiento en diferentes cuadrantes del espectro, en los cuales pueden observarse a detalle las señales producidas por los ^1H que conforman correlaciones en el espacio entre aminoácidos a menos de 5 Å de distancia que conforman a pCEMP1. Análisis de espectros con el software CARA.

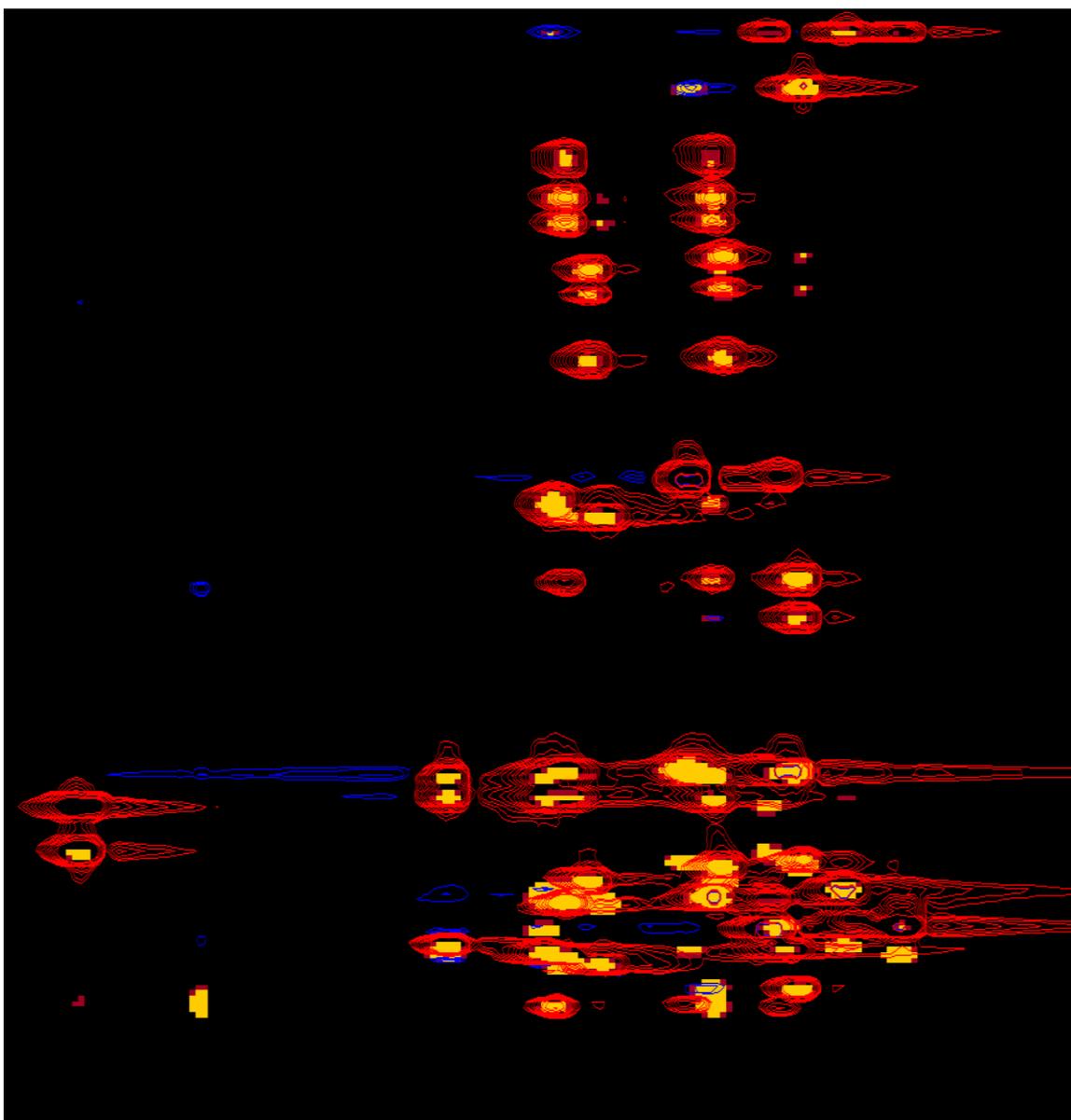


Imagen 18. Espectro de RMN homonuclear bidimensional NOESY del péptido sintético. Pueden observarse a detalle las señales producidas por los ^1H que conforman correlaciones en el espacio entre aminoácidos a menos de 5 Å de distancia que conforman a pCEMP1. Análisis de espectros con el software CARA.

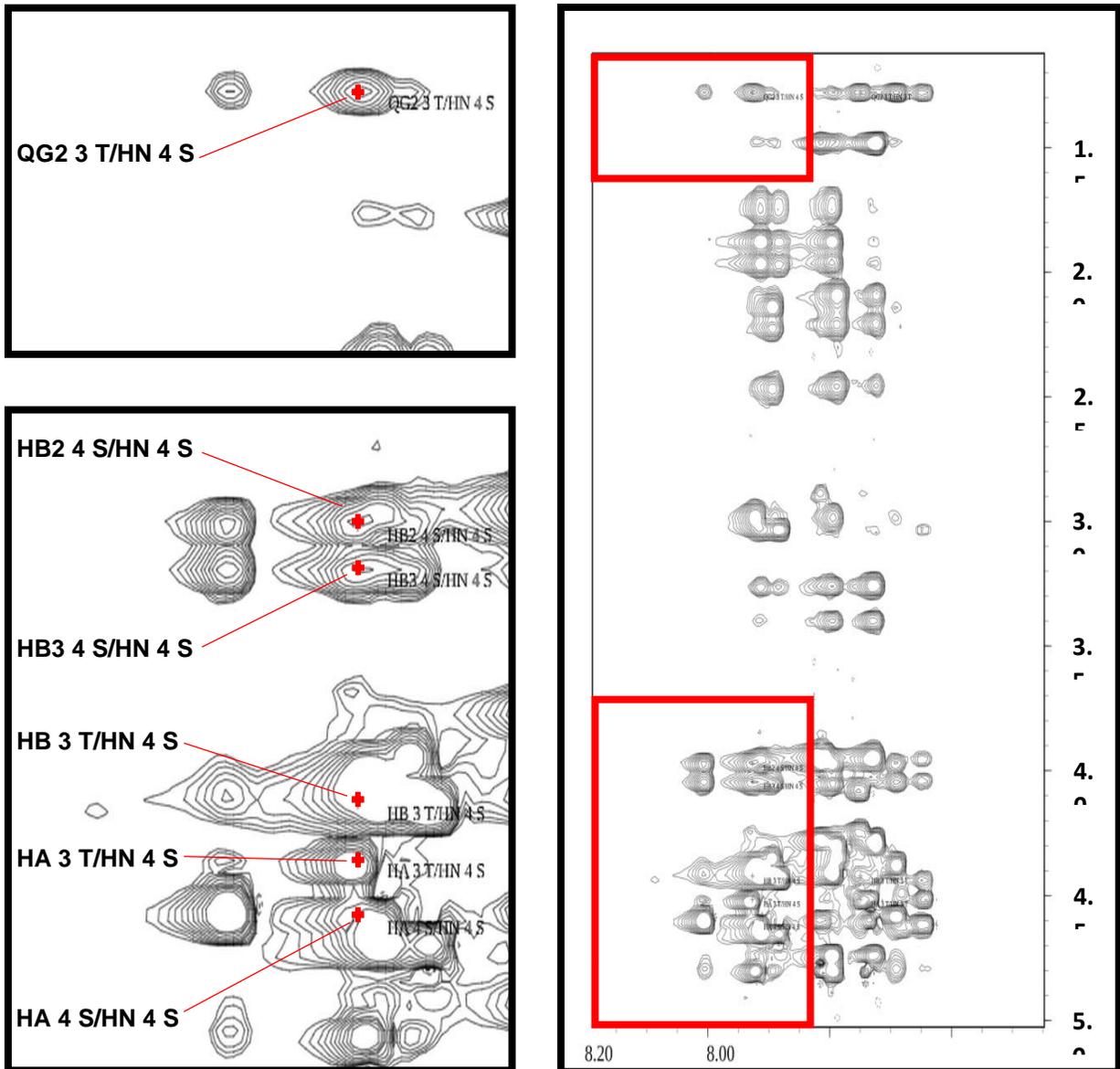


Imagen 19. Espectro de RMN bidimensional NOESY de pCEMP1. Se muestran las diversas zonas en las cuales se observan interacciones específicas de protones de diversos aminoácidos, en este caso Serina y Treonina. Estas señales son indicativas de la presencia de estructura secundaria.

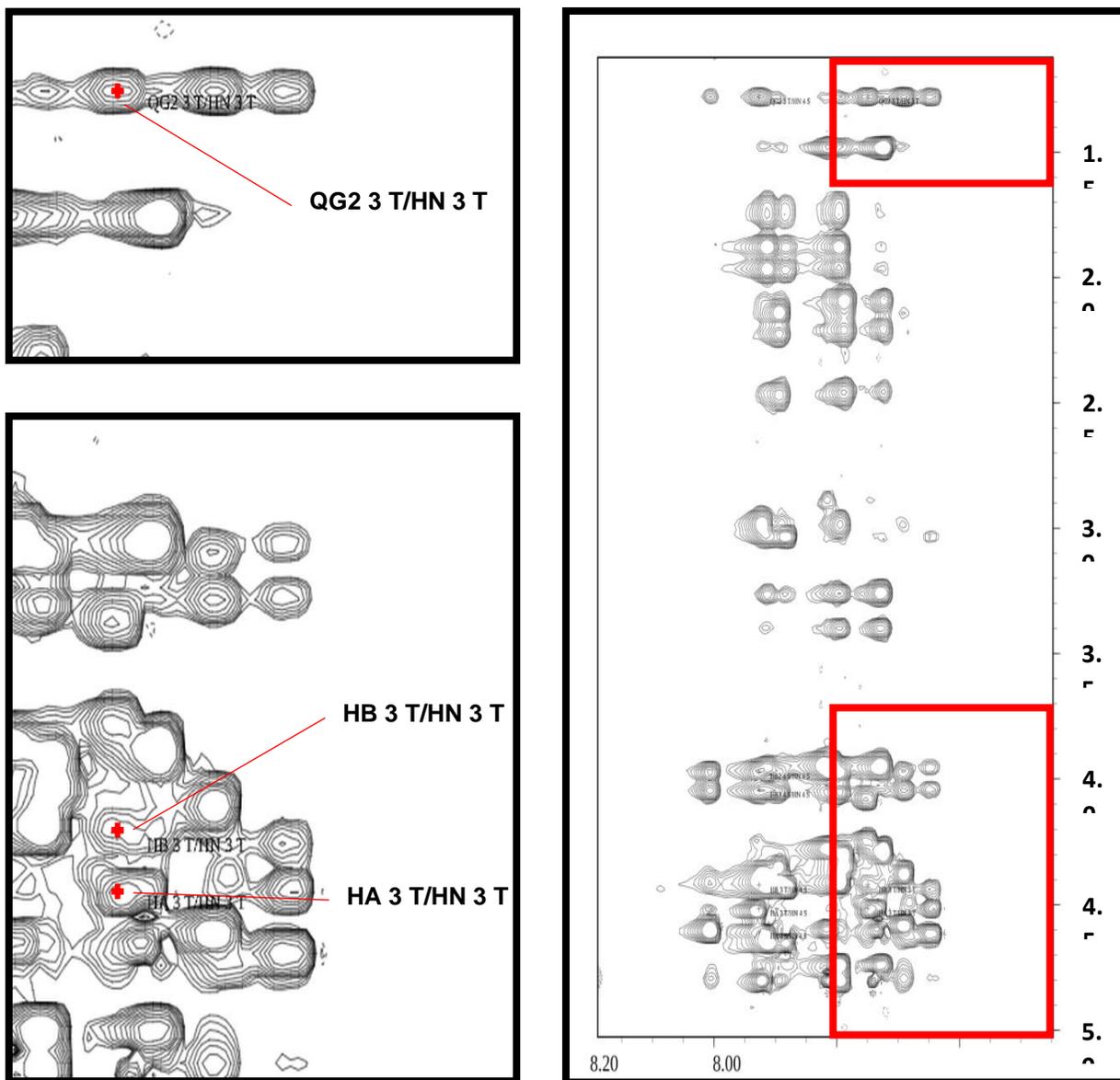


Imagen 20. Espectro de RMN bidimensional NOESY de pCEMP1. Se muestran las diversas zonas en las cuales se observan interacciones específicas de protones de diversos aminoácidos, en este caso Serina y Treonina. Estas señales son indicativas de la presencia de estructura secundaria.

Elaboración del modelo tridimensional

Cálculo estructural

Los cálculos estructurales se realizaron con el software CYANA 2.1. Para la elaboración del modelo del péptido de CEMP1 (pCEMP1) se empleó un número de 20 estructuras de 200 que contaran con valores de energía bajos y que no presentaran violaciones (Imagen 21). Aunado a esto, se realizó un ajuste del modelo obtenido por dinámica molecular con el software AMBER 9. La estructura final se obtuvo con un RMSD (Root-mean-square deviation of atomic positions) de 0,39, el cual es un dato sumamente favorable y apto para la validación de este modelo.

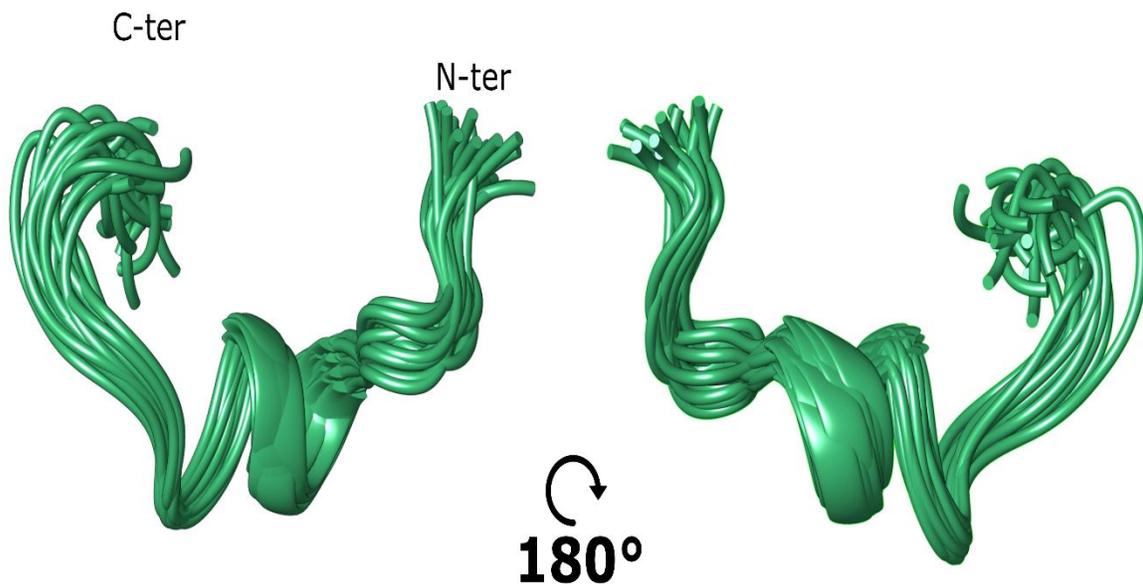


Imagen 21. Acumulación de las 20 representaciones estructurales obtenidas del pCEMP-1, Puede observarse que los 20 modelos obtenidos coinciden en una estructura secundaria central de tipo hélice α , mientras que sus extremos predominan el random coil.

Mediante el servidor informático I-TASSER se realizó la construcción de modelos teóricos de pCEMP1 y de hrCEMP-1 (Imagen 22). A partir de estos modelos generados y mediante el empleo del software UCSF Chimera (Gasteiger *et al*, 2005; Zhang, 2008) y PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) se hizo un

análisis de la estructura, el cual se comparó con el modelo experimental de pCEMP1 obtenido por RMN (Imagen 22), donde la principal similitud radica en su conformación de estructura secundaria en los cuales la hélice α (30%) está conformada por los residuos SQQAGH que corresponden a la posición 8, 9, 10, 11, 12 y 13 en la secuencia del péptido y de la proteína recombinante. Este dato es relevante ya que tenemos el primer antecedente experimental de estructura de pCEMP1, el cual es muy similar en conformación a las simulaciones, pero, dado que esta proteína y el péptido mismo no tiene homólogos en secuencia y por ende en estructura el resultado tiene mayor peso debido a que es el primero y único existente.

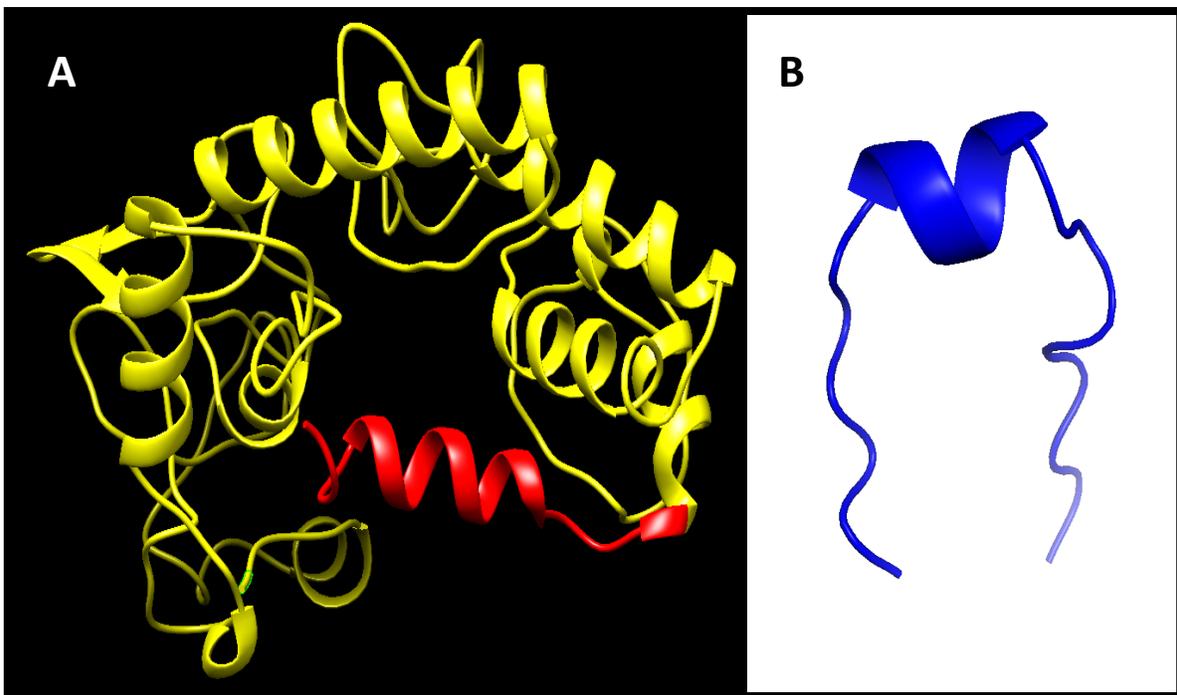


Imagen 22. Estructuras tridimensionales teóricas obtenidas a partir del servidor informático I-TASSER. A) Modelo teórico de hrCEMP-1, se observa la secuencia de aminoácidos que conforma a pCEMP1 (MGTSSSTDSQQAGHRRRCSTSN) (color rojo) donde la estructura secundaria predominante es la hélice α (65%), conformado por los residuos de aminoácidos STDSQQAGHRRRC y N. (Posiciones 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 20). B) Modelo teórico de pCEMP1, posee mayoritariamente random coil (70%), con un porcentaje menor (30%) de hélice α , el cual está conformado por los residuos de aminoácidos DSQQAG (Posiciones 7, 8, 9, 10, 11 y 12 en la secuencia).

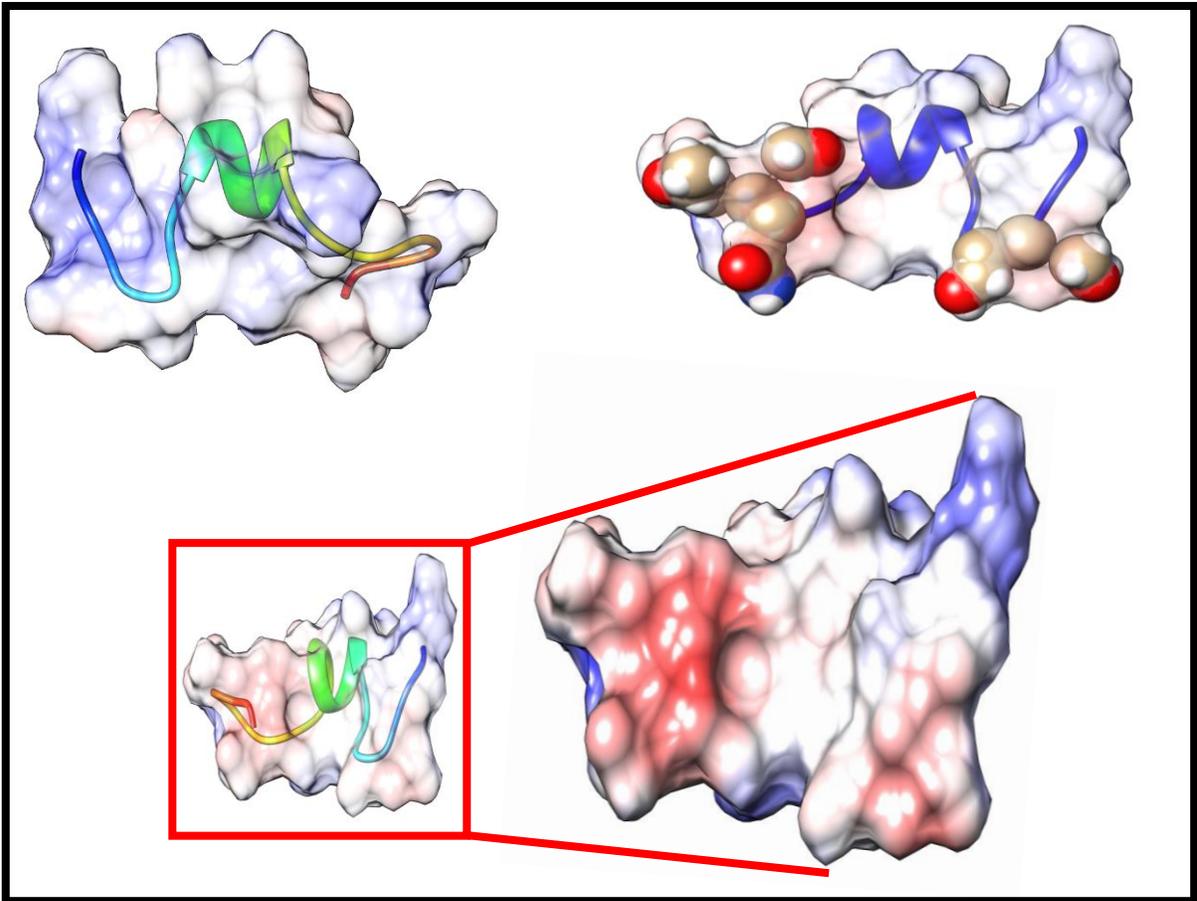


Imagen 23. Modelo de acceso a solubilidad solvente de pCEMP-1. Superficie hidrofílica (azul), zonas neutras de interacción hidrofílica (blanco) y zonas de interacción hidrofóbica (rojo). Puede observarse la estructura secundaria conformada por hélice α por los aminoácidos SQQAGH (Posiciones 8, 9, 10, 11, 12 y 13). El análisis comparativo entre los modelos teóricos y los experimentales arrojan información sobre los aminoácidos que conforman las hélices α , específicamente SQQAG (Posiciones 8, 9, 10, 11 y 12 en la secuencia). Estos son una constante en la conformación estructural de hélice α .

El modelo experimental tridimensional obtenido permite analizar diferentes proyecciones del péptido, así como las interacciones de carga en superficie, estructura secundaria, composición atómica general y específica de la secuencia (Imagen 24), además, con el modelo se pueden hacer medidas de longitud de este, las cuales arrojan datos relevantes relacionados a interacciones intermoleculares y formación de complejos peptídicos (Imagen 25).

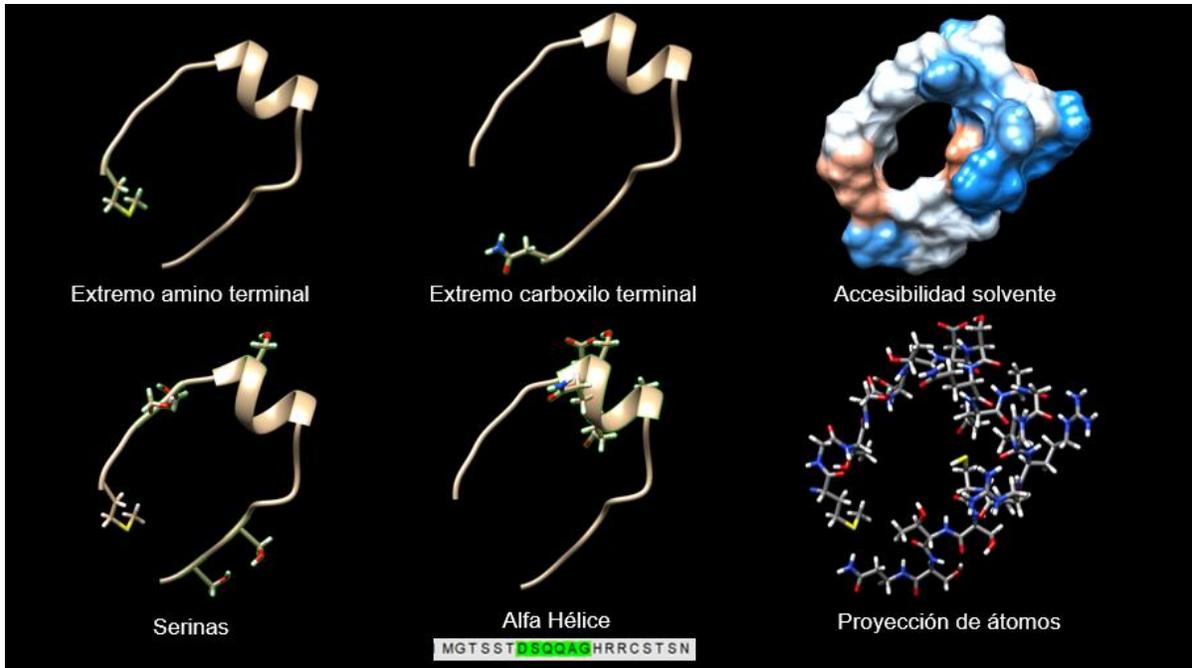


Imagen 24. Diversas representaciones del modelo experimental de pCEMP1.

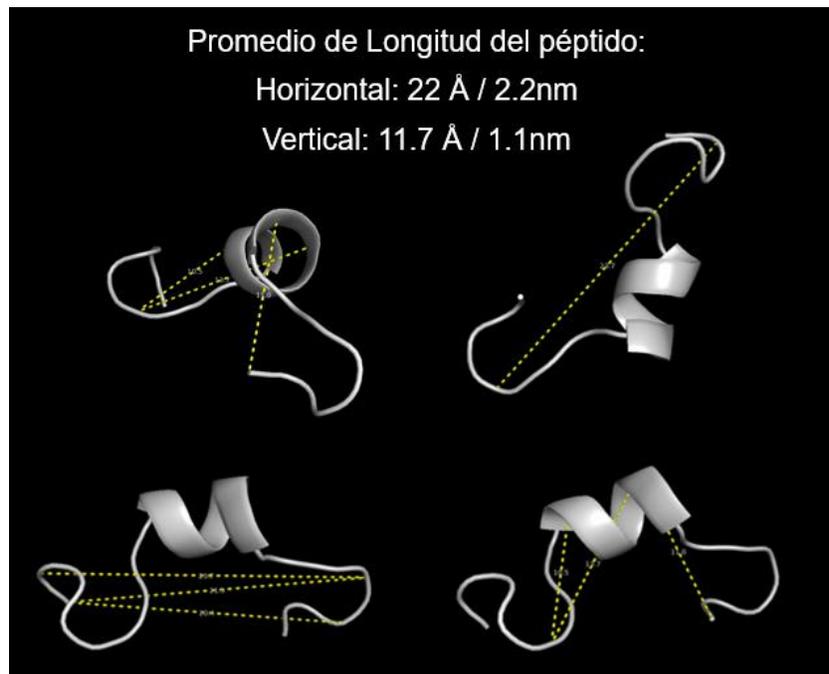


Imagen 25. Promedio de longitud de pCEMP1. Se observa que el promedio de longitud horizontal es de 22 Angstroms (2.2 nm), mientras que el promedio de longitud horizontal de pCEMP1 es de 11.7 Angstroms (1.1nm).

Validación del modelo 3D de pCEMP1.

Para conocer la validez del modelo experimental de pCEMP1 obtenido mediante RMN se llevaron a cabo múltiples análisis computacionales, iniciando con la comparación de estructuras del péptido resueltas por RMN usando la herramienta MatchMaker de UCSF Chimera usando el algoritmo de Needleman-Wunsch/BLOSUM-62.

A la estructura elegida se le hizo una minimización de energía usando el campo de fuerza AMBER ff14SB: STEPS: 100; Steepest descent: 100. Las conformaciones de los rotámeros cambiaron significativamente, pero no la estructura global. Se evaluaron choques estéricos, rotámeros, cargas y ángulos diedros (Imagen 26, 27 y 28) en el gráfico de Ramachandran usando el programa MolProbity del servidor de Duke University. Como característica principal, este servidor lleva a cabo el análisis de contacto de todos los átomos, agregando y optimizando los átomos de hidrogeno (Los Hidrógenos son aproximadamente la mitad de los átomos que conforman a una proteína y hacen la mayoría de los contactos intermoleculares) el servidor analiza si existen choques estéricos, contactos de van der Waals favorables y otras interacciones atómicas relevantes e indispensables en el plegamiento de biomoléculas. Con este servidor se pueden llevar a cabo criterios de evaluación tradicionales como el Ramachandran, análisis de rotámeros y medidas de geometría de la molécula analizada que se expresan en datos gráficos y numéricos que pueden ser comparados o empleados como indicadores de validez del modelo tridimensional experimental a analizar.

Los resultados son buenos, sin embargo, aún existen algunos aminoácidos mejorables que probablemente se puedan ser optimizados con estrategias de dinámica molecular.

Choose the outputs you want:
Default options have been selected based on the content of the submitted file.
Follow the ? symbols for more information on the validation options.

<input checked="" type="checkbox"/> 3-D kinemage graphics	<input checked="" type="checkbox"/> Charts, plots, and tables
Universal	Universal
<input checked="" type="checkbox"/> Clashes ?	<input checked="" type="checkbox"/> Clashes & clashscore ?
<input checked="" type="checkbox"/> Hydrogen bonds ?	<input checked="" type="checkbox"/> Geometry evaluation ?
<input checked="" type="checkbox"/> van der Waals contacts ?	
<input checked="" type="checkbox"/> Geometry evaluation ?	
Protein	Protein
<input checked="" type="checkbox"/> Ramachandran plots ?	<input checked="" type="checkbox"/> Ramachandran plots ?
<input checked="" type="checkbox"/> Rotamer evaluation ?	<input checked="" type="checkbox"/> Rotamer evaluation ?
<input checked="" type="checkbox"/> Cβ deviations ?	<input checked="" type="checkbox"/> Cβ deviations ?
<input checked="" type="checkbox"/> Cis-Peptide evaluation ?	<input checked="" type="checkbox"/> Cis-Peptide evaluation ?
<input checked="" type="checkbox"/> CaBLAM backbone markup ?	<input type="checkbox"/> Show cis-nonPro and twisted peptide statistics even if the model has none
	<input checked="" type="checkbox"/> CaBLAM backbone evaluation ?

Imagen 26. Valores analizados del modelo experimental de pCEMP1 con MolProbity

Summary statistics

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	7.29	85 th percentile* (N=1784, all resolutions)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
Protein Geometry	Poor rotamers	0	0.00% Goal: <0.3%
	Favored rotamers	170	100.00% Goal: >98%
	Ramachandran outliers	0	0.00% Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	150	83.33% Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-6.27 ± 0.43	Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score	2.09	71 st percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	Cβ deviations >0.25Å	0	0.00% Goal: 0
	Bad bonds:	0 / 1450	0.00% Goal: 0%
Bad angles:	0 / 1930	0.00% Goal: <0.1%	
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 0	0.00% Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
Low-resolution Criteria	CaBLAM outliers	0	0.0% Goal: <1.0%
	CA Geometry outliers	0	0.00% Goal: <0.5%
Additional validations	Chiral volume outliers	0.210	
	Waters with clashes	0/0	0.00% See UnDowser table for details

In the two column results, the left column gives the raw count, right column gives the percentage.
 * 100th percentile is the best among structures of comparable resolution; 0th percentile is the worst. For clashscore the comparative set of structures was selected in 2004, for MolProbity score in 2006.
 ^ MolProbity score combines the clashscore, rotamer, and Ramachandran evaluations into a single score, normalized to be on the same scale as X-ray resolution.
 Key to table colors and cutoffs here: [?](#)

Imagen 27. Reporte de la validación estereoquímica del péptido pCEMP-1.

Summary statistics

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	4.37	95 th percentile* (N=1784, all resolutions)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
Protein Geometry	Poor rotamers	0	0.00% Goal: <0.3%
	Favored rotamers	170	100.00% Goal: >98%
	Ramachandran outliers	0	0.00% Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	150	83.33% Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-6.26 ± 0.43	Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score [^]	1.90	81 st percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	Cβ deviations >0.25Å	0	0.00% Goal: 0
	Bad bonds:	0 / 1450	0.00% Goal: 0%
Bad angles:	0 / 1930	0.00% Goal: <0.1%	
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 0	0.00% Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
Low-resolution Criteria	CaBLAM outliers	0	0.0% Goal: <1.0%
	CA Geometry outliers	0	0.00% Goal: <0.5%
Additional validations	Chiral volume outliers	0.210	
	Waters with clashes	0/0	0.00% See UnDowser table for details

In the two column results, the left column gives the raw count, right column gives the percentage.

* 100th percentile is the best among structures of comparable resolution; 0th percentile is the worst. For clashscore the comparative set of structures was selected in 2004, for MolProbity score in 2006.

[^] MolProbity score combines the clashscore, rotamer, and Ramachandran evaluations into a single score, normalized to be on the same scale as X-ray resolution.

Key to table colors and cutoffs here: [?](#)

Imagen 28. Resultado de los valores analizados del modelo experimental de pCEMP1 por el servidor MolProbity. Se observan resultados favorables en las principales características estereoquímicas del modelo tridimensional, lo que se traduce como validez estructural del mismo.

Gráfico de Ramachandran

Puede observarse en el gráfico de Ramachandran obtenido mediante MolProbity (Imágenes 29 y 30), el cual es una representación de los ángulos ψ y ϕ que derivan de las 20 representaciones estructurales del cálculo en el software CYANA. Podemos identificar que el 43.4% de los pares de los ángulos diedros se localizan en la región denominada más favorable, mientras que el 56.6% está localizada en la región adicionalmente permitida.

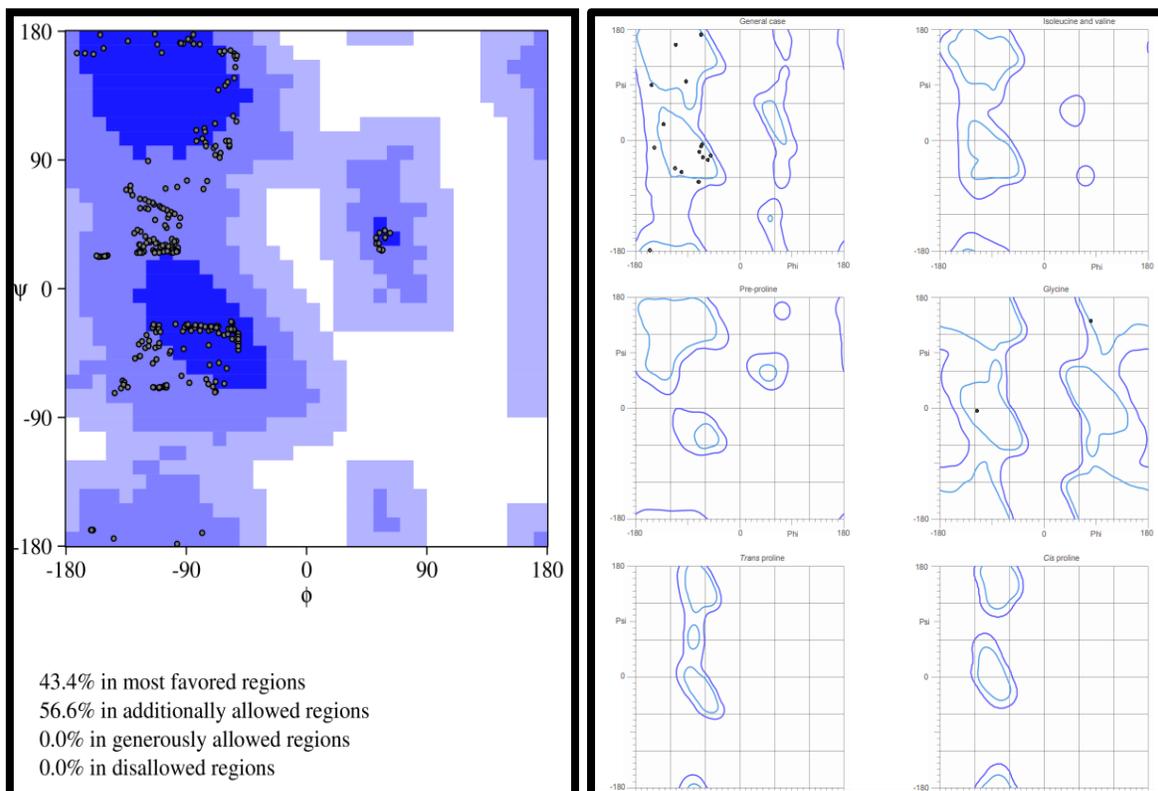


Imagen 29. Gráfico de Ramachandran derivado del análisis mediante MolProbity de las 20 estructuras calculadas de pCEMP1. Pueden identificarse 4 regiones con intensidades colorimétricas distintas, las cuales, estadísticamente son clasificadas en este orden: No permitidas (Blanco), Regiones generosamente permitidas (Azul claro), Regiones adicionalmente permitidas (Azul intermedio) y Regiones favorecidas (Azul intenso). Los aminoácidos con ángulos diedros no permitidos fueron reconstruidos nuevamente usando la librería de Dunbrack. Se minimizaron nuevamente usando el campo de fuerza AMBER ff14SB: STEPS: 100; Steepest descent: 100.

#	Alt	Res	High B	Ramachandran	Rotamer
			Avg: 0.00	Outliers: 0 of 180	Poor rotamers: 0 of 170
A 1		MET	0	-	Favored (64.6%) <i>ttp</i> chi angles: 182.3,178,71.4
A 2		GLY	0	Favored (3.67%) Glycine / 81.1,143.4	-
A 3		THR	0	Favored (12.65%) General / -66.1,-6.3	Favored (75.2%) <i>p</i> chi angles: 60
A 4		SER	0	Favored (50.5%) General / -68.6,-9.5	Favored (90.5%) <i>p</i> chi angles: 66.7
A 5		SER	0	Allowed (0.3%) General / -149.4,-11.3	Favored (97.3%) <i>p</i> chi angles: 63.5
A 6		THR	0	Allowed (1.4%) General / -154.8,91.7	Favored (8.3%) <i>t</i> chi angles: 193.2
A 7		ASP	0	Favored (4.91%) General / -68.9,173.9	Favored (24.7%) <i>p0</i> chi angles: 67.2,335.3
A 8		SER	0	Favored (6.24%) General / -51.7,-24.9	Favored (99.4%) <i>p</i> chi angles: 65.6
A 9		GLN	0	Allowed (0.59%) General / -73.0,-67.2	Favored (39.2%) <i>tp40</i> chi angles: 192.8,65.1,23
A 10		GLN	0	Favored (64.61%) General / -56.8,-31.3	Favored (59.7%) <i>tt0</i> chi angles: 183.9,176.7,339
A 11		ALA	0	Favored (62.44%) General / -71.2,-18.7	-
A 12		GLY	0	Favored (15.34%) Glycine / -117.3,-5.0	-
A 13		HIS	0	Favored (3.09%) General / -113.9,-45.2	Favored (11.4%) <i>t-170</i> chi angles: 192.9,162.9
A 14		ARG	0	Favored (4.19%) General / -133.1,27.7	Favored (35.6%) <i>mmm160</i> chi angles: 291.9,292.3,295,170.8
A 15		ARG	0	Favored (21.78%) General / -112.7,157.1	Favored (83.7%) <i>ttt180</i> chi angles: 182.3,175.7,179.2,181.1
A 16		CYS	0	Favored (8.45%) General / -157.1,-179.7	Favored (2.4%) <i>t</i> chi angles: 203.6
A 17		SER	0	Favored (68.31%) General / -65.5,-27.2	Favored (92.1%) <i>p</i> chi angles: 66.5
A 18		THR	0	Favored (3.34%) General / -102.4,-51.5	Favored (73.7%) <i>p</i> chi angles: 59.8
A 19		SER	0	Favored (10.23%) General / -94.4,97.5	Favored (42.5%) <i>t</i> chi angles: 178.4
A 20		ASN	0	-	Favored (73%) <i>m-40</i> chi angles: 293.4,303

Imagen 30. Análisis de resultados del Gráfico de Ramachandran mediante MolProbity para los aminoácidos que conforman a pCEMP1. Se observa que el 100% de los aminoácidos analizados caen en regiones favorables y permitidas del gráfico.

Depósito del modelo tridimensional experimental de pCEMP1 en el Protein Data Bank (PDB)

El modelo del péptido de CEMP1 obtenido mediante resonancia magnética nuclear fue depositado en el Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/structure/7TB9>).

Este modelo puede ser consultado con el número de acceso **7TB9**.

Además de la carga del modelo en el PDB, este fue depositado en el Biological Magnetic Resonance Data Bank (BRBM)

(https://bmrbl.io/data_library/summary/index.php?bmrblid=30978), el modelo tridimensional puede ser consultado con el número de acceso **30978**.

Estudio de estructura cuaternaria de pCEMP1

Comportamiento de oligomerización/monodispersidad en solución de pCEMP1

Para determinar el comportamiento de oligomerización en solución de pCEMP1 se realizaron ensayos de DLS utilizando incrementos de temperatura en la misma condición. Empleando este ensayo se comprobó que pCEMP1 no adopta un estado monomérico, ya que durante el análisis esta molécula genera interacciones con las de su mismo tipo (Tabla 3). En el estudio se visualizó que a 37 °C (Imagen 31) existe una gran polidispersidad en las moléculas, esto indica que pCEMP1 está en múltiples estados de oligomerización o estados de asociación entre ella misma, aunque existe una diferencia, la cual radica en que solo aparecen dos poblaciones específicas y una de ellas es predominante en radio hidrodinámico. Con estos datos estimados de radio hidrodinámico y la información obtenida del análisis de distancias de pCEMP1, se realizó un cálculo del número de unidades monoméricas (1 unidad monomérica = 2.2 nm) que conforman a las poblaciones observadas. Teniendo así: Población 1, conformada por: 92 unidades monoméricas de pCEMP1 y población 2, conformada por: 2455 unidades monoméricas de pCEMP1.

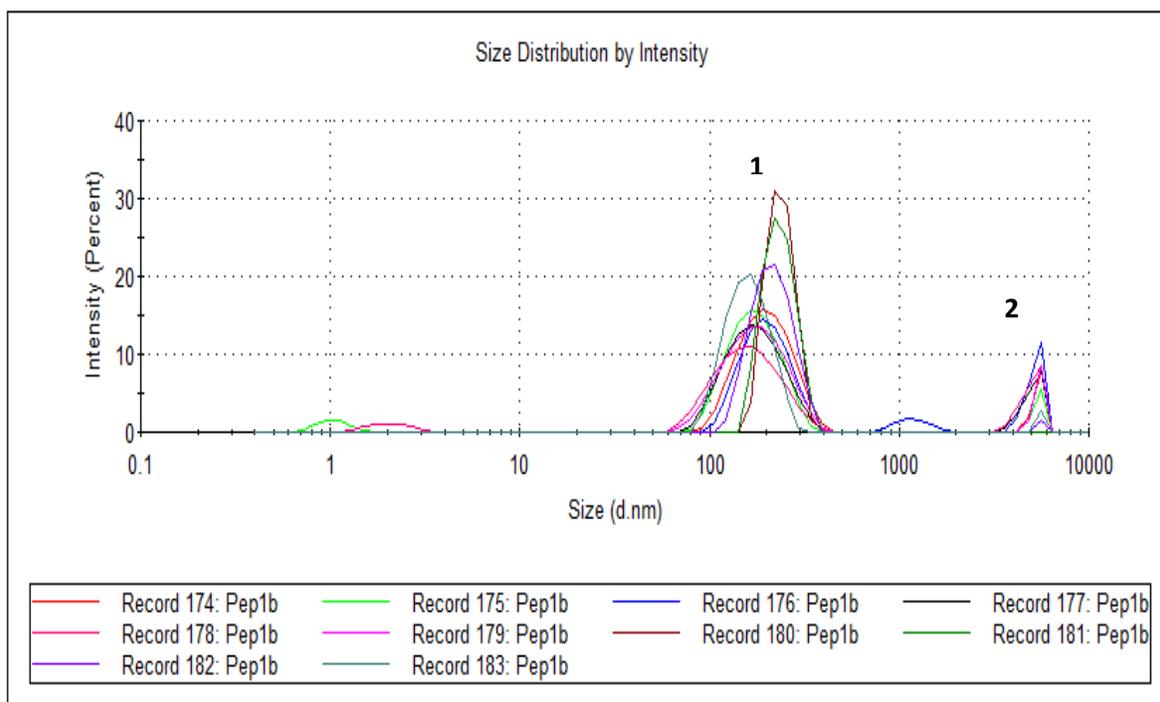


Imagen 31. Ensayos de DLS. A, Temperaturas de 37 °C. pCEMP1 se encuentra en dos estados de oligomerización o estados de asociación entre ella misma. Predomina en tamaño la población 1.

Temperatura	Pico	Radio Hidrodinámico	Porcentaje poblacional
37°C	1	203.7 nm	90.3%
	2	5403 nm	9.7%

Tabla 3. Análisis de DLS de pCEMP1. Temperatura de 37 °C. Puede observarse la presencia de dos picos en el espectro, su respectivo radio hidrodinámico y su porcentaje poblacional.

El índice de hidrofobicidad de pCEMP1 (GRAVY/Grand average of hydropathicity) es de -1.345 (<https://web.expasy.org/protparam/>), según este dato, que denota el potencial hidrofílico del péptido, donde a mayor valor de GRAVY (Kyte y Doolittle, 1982) más hidrofóbico es este y con el modelo tridimensional experimental de pCEMP1 (Imagen 32) inferimos que pCEMP1 es parcialmente hidrofóbico teniendo una región en su superficie que podría exponer secuencias de aminoácidos que participen en la interacción inter molecular, este dato explicaría la formación de oligómeros de pCEMP1 en DLS promovidos por la interacción entre estas superficies hidrofóbicas. Debido a estos resultados se hipotetizó que los resultados en el DLS deberían estar indicando que, dadas las características de superficie, los monómeros de pCEMP1 deberían estar formando algún tipo de complejo peptídico estabilizado por la carga hidrofóbica de la molécula, por lo cual, se planteó la hipótesis de la formación de complejos peptídicos de pCEMP1 en solución.

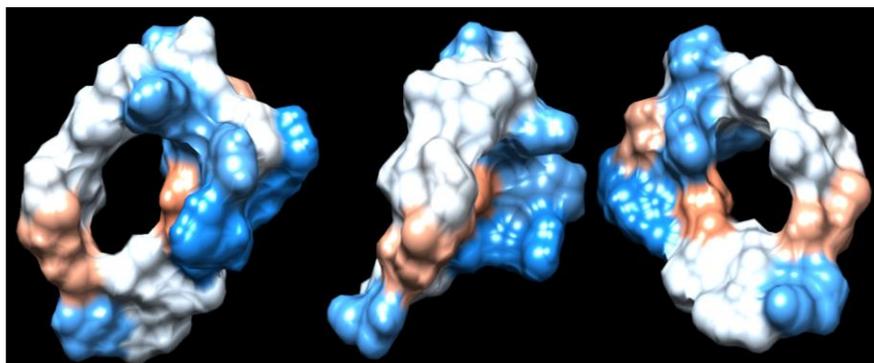


Imagen 32. Modelo de accesibilidad solvente de pCEMP1. Superficie hidrofílica (azul), zonas neutras de interacción hidrofílica (blanco) y zonas de interacción hidrofóbica (rojo).

Análisis de interacciones intermoleculares de pCEMP1 *in silico* (Formación de complejos peptídicos).

Ensamble oligomérico.

Debido a los antecedentes experimentales obtenidos mediante Dispersión dinámica de luz (DLS) en el cual se sugieren agregados estructurales homogéneos de alto peso molecular, se buscó un oligómero posible para el péptido pCEMP1.

El docking molecular proteína-proteína de cuerpo rígido se realizó usando el servidor ClusPro (<https://cluspro.org/>) que evalúa exhaustivamente conformaciones, califica con RMSD eligiendo las 1000 estructuras de menor energía, finalmente minimiza energía usando el campo de fuerzas de CHARMM. Del docking se encontraron dos tipos de interacción péptido-péptido predominantes y no excluyentes entre sí. Lo anterior sugiere que cada péptido podría interactuar con algunas otras cadenas polipeptídicas formando grandes oligómeros. (Imagen 33)

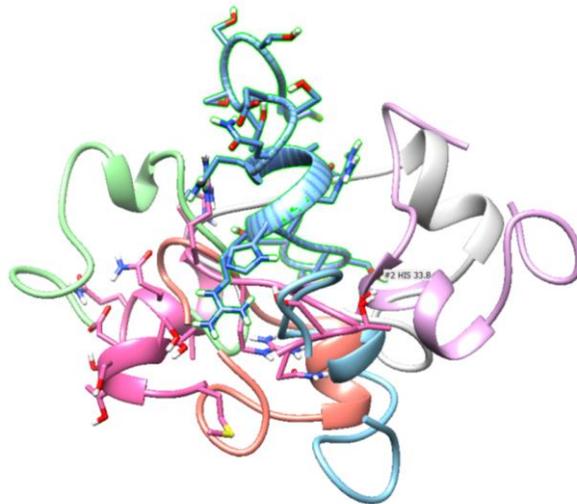


Imagen 33. Resultado del Docking proteína-proteína del pCEMP-1. La cadena de referencia es la cadena azul con rayas, se muestran distintos resultados de la interacción con esa cadena.

Para encontrar estados oligoméricos mayores, se usó el servidor Rosette de Rosetta (<https://rosie.rosettacommons.org/>) que permite predecir ensamblajes proteicos cíclicos (Imagen 34). Se hizo docking del péptido pCEMP-1 repetido diez veces y se encontraron oligómeros que presentan intercaras similares a las de los resultados de ClusPro (Imagen 35). Se evaluaron estereoquímicamente y se minimizaron con el protocolo anteriormente descrito.

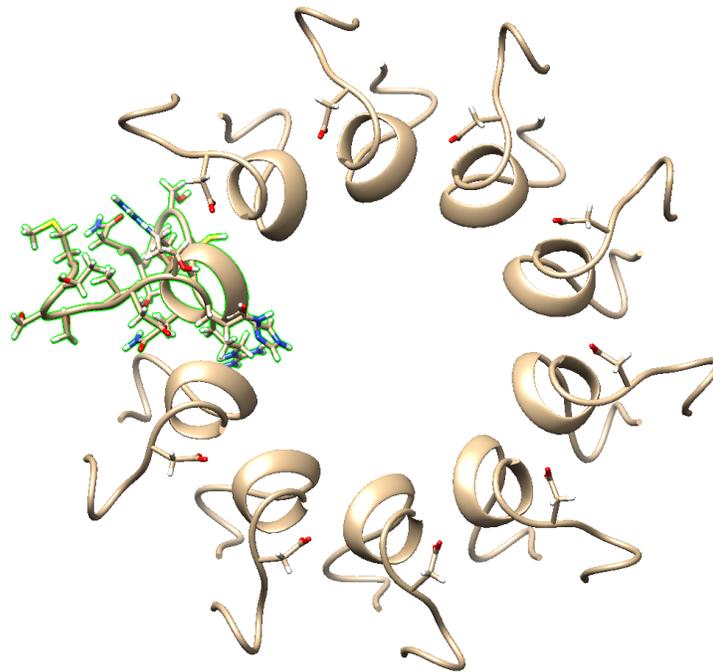


Imagen 34. Ensamble oligomérico cíclico de pCEMP1.

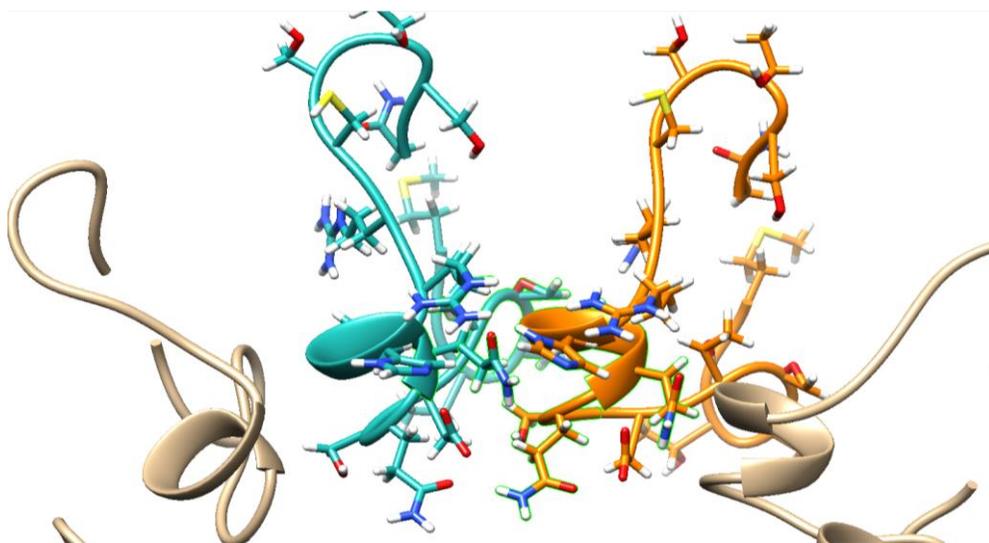


Imagen 35. Intercara entre monómero en el ensamble cíclico.

Con los resultados obtenidos de la construcción de los ensamblajes proteicos se pudo obtener información asociada a distancias intermoleculares del complejo (Imagen 36), carga de superficie (Imagen 37) y datos relacionados con el papel de aminoácidos que participan en la estabilidad del complejo (Imagen 38).

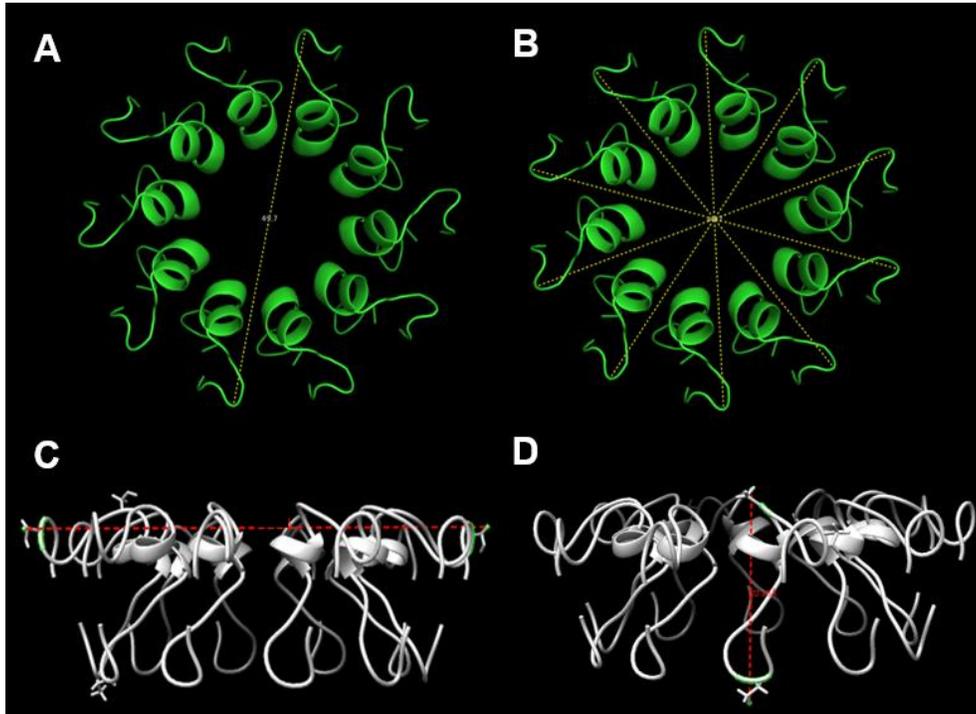


Imagen 36. Ensamble oligomérico cíclico. Caracterización morfométrica del ensamble simétrico, el diámetro del ensamble es de 49.7 Å / 4.97nm en A y B, 49.7 Å / 4.97nm en C y 22.25 Å / 2.22nm en D.

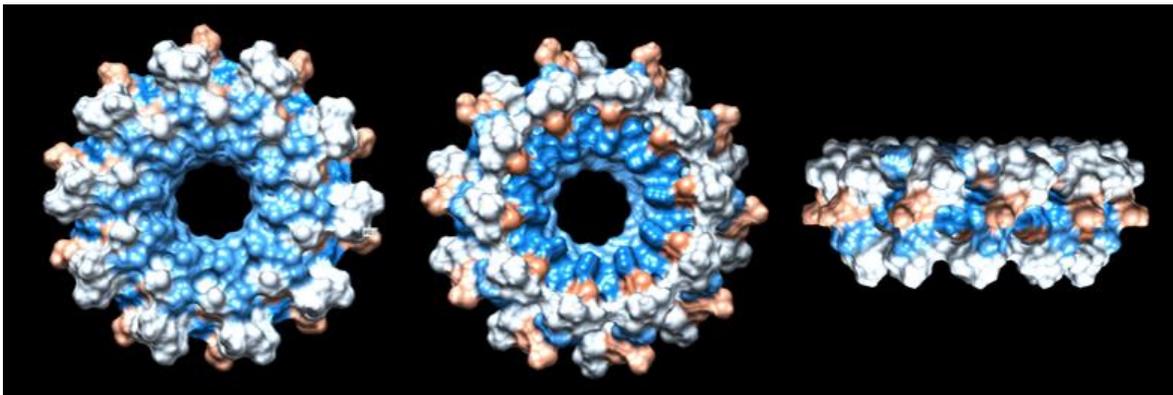


Imagen 37. Modelo de accesibilidad solvente del ensamble oligomérico cíclico de pCEMP1. Superficie hidrofílica (azul), zonas neutras de interacción hidrofílica (blanco) y zonas de interacción hidrofóbica (rojo).

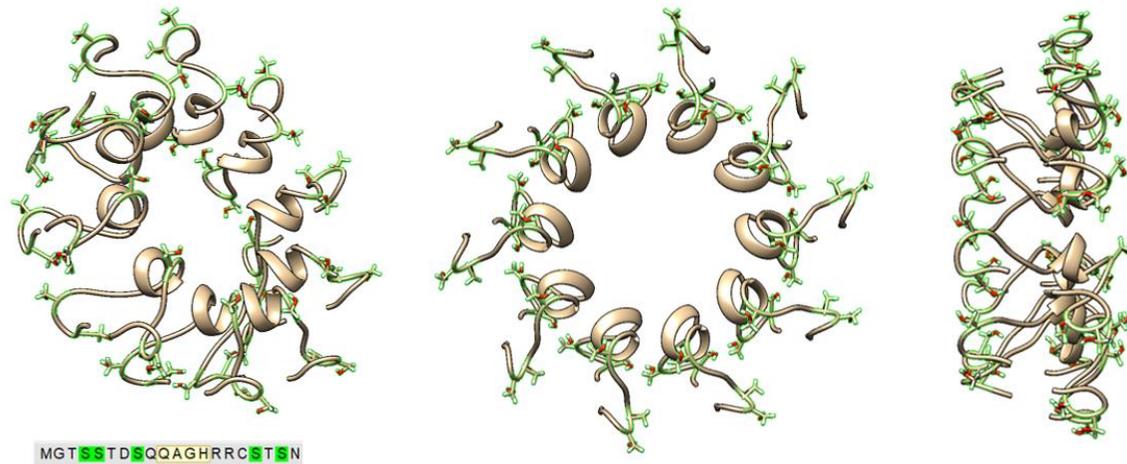


Imagen 38. Ensamble oligomérico cíclico de pCEMP1 donde se exponen los aminoácidos Serina (verde) responsables de la interacción entre complejos peptídicos.

Análisis de interacciones intermoleculares de pCEMP1 *in silico* (Formación de complejos peptídicos y su interacción con Hidroxiapatita).

Debido a los antecedentes de estudio sobre mineralización realizados con pCEMP-1, se realizó un docking molecular del péptido pCEMP1 con hidroxiapatita usando Autodock Vina. La caja de simulación fue definida a mano abarcando el total de la superficie del péptido (Imagen 39). El docking muestra que hay una parte de pCEMP-1 en donde es favorecida la interacción con la hidroxiapatita. Esta cara presenta cuatro aminoácidos que forman interacciones electrostáticas con la hidroxiapatita, estos son Asp7, Gln10, Arg14 y Ser19. (Imagen 40)

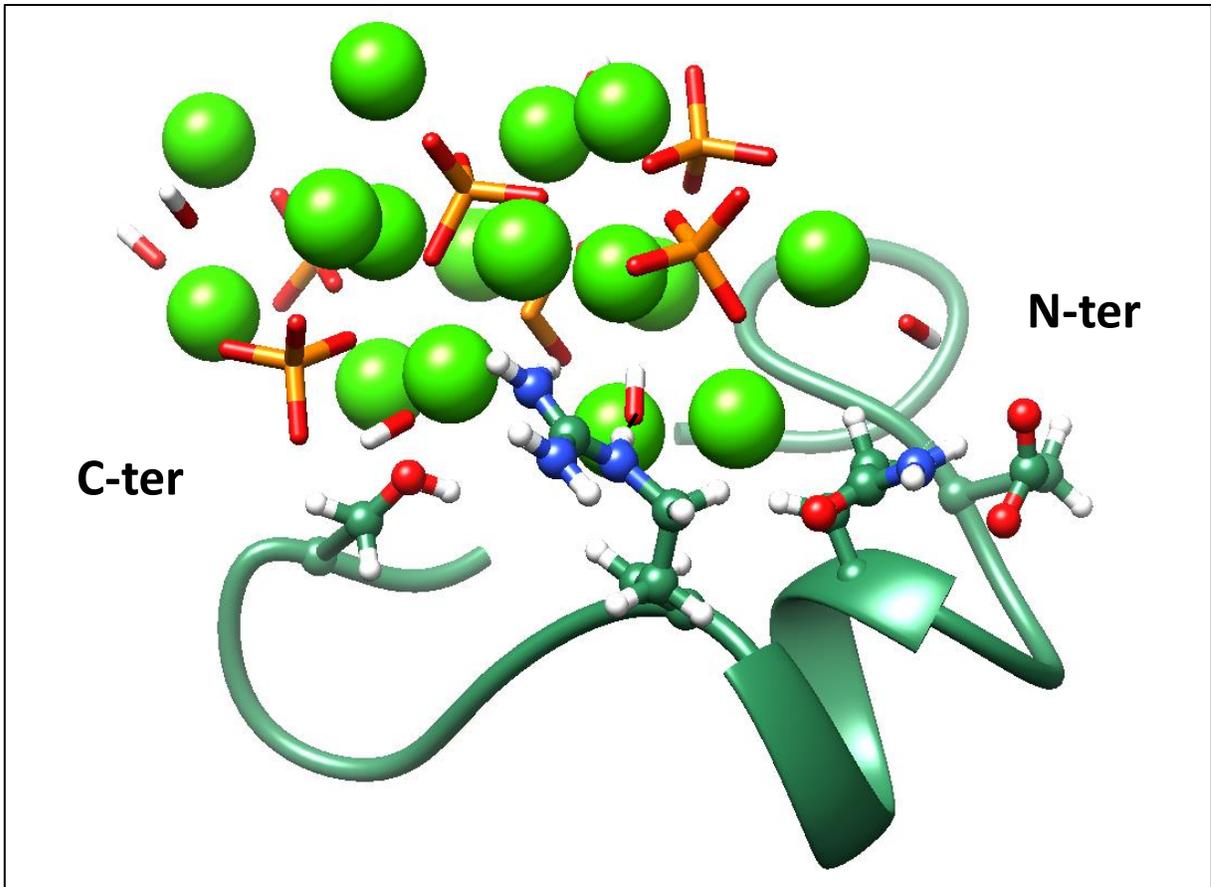


Imagen 39. Resultado de docking molecular de la hidroxiapatita sobre el pCEMP-1.

Se generaron múltiples simulaciones de acoplamiento molecular para saber cuál podría ser la posible interacción con la hidroxiapatita principal molécula mineral involucrada en la formación de hueso, cemento radicular y dentina (Imagen 37, 38 y 39). Puede observarse que, debido a la carga presente en la superficie y la disposición del área del péptido, es posible acoplar una molécula de hidroxiapatita con pCEMP1, específicamente en el plano cristalino 2-0-0 con pCEMP1 y sus interacciones con aminoácidos que conforman al péptido.

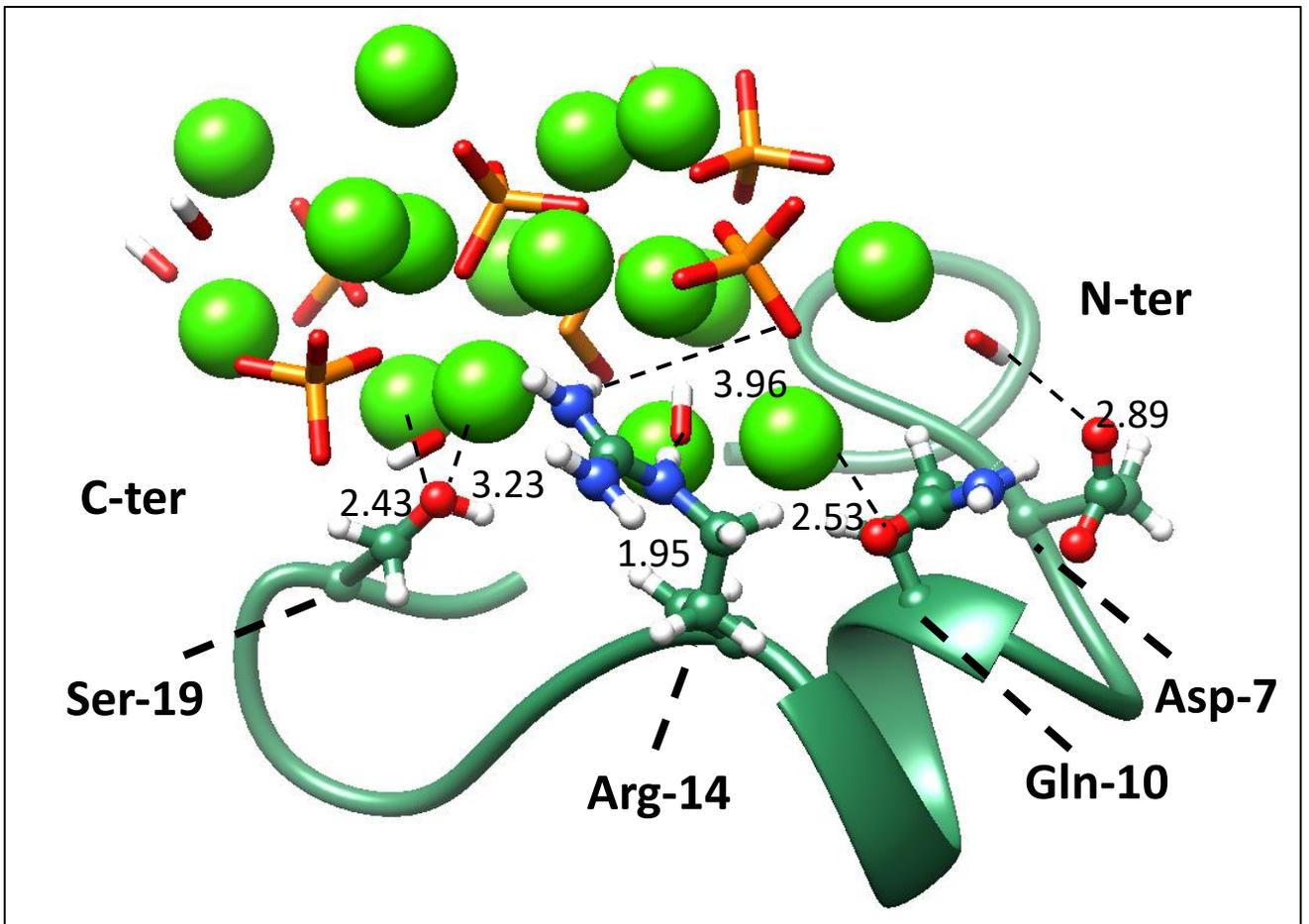


Imagen 40. Acoplamiento molecular entre Hidroxiapatita (HA) y el péptido CEMP-1-p1. Se observan múltiples interacciones electrostáticas entre los átomos de CEMP-1-p1 y la hidroxiapatita. Serina-19 átomos de oxígeno y calcio (2,43 Å y 3,23 Å). Arginina-14 hidrógeno y oxígeno del grupo fosfato de HA (3,96 Å) y Arginina-14 hidrógeno y oxígeno del grupo hidroxilo de HA (1,95 Å). Oxígeno de Glutamina-10 y un átomo de calcio de HA (2,53 Å). Oxígeno del ácido aspártico-7 y un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo HA (2,89 Å).

El docking se repitió empleando el ensamble oligomérico cíclico molecular del péptido pCEMP1 con hidroxiapatita usando Autodock Vina. El docking muestra que hay una parte de este ensamble oligomérico cíclico donde los aminoácidos Histidina (azul) y Ácido Aspártico (rojo) interactúan con la cara cristalina de la hidroxiapatita 2-0-0. Estos aminoácidos son los responsables de la interacción directa con los iones calcio (Histidina) y fosfato (Ácido Aspártico) de la hidroxiapatita (Imagen 41). Cabe señalar que todas las interacciones Ensamble cíclico-Hidroxiapatita comparten la afinidad por el centro de la estructura peptídica y por la cara cristalina 2-0-0 y que esta no está limitada a una sola molécula, ya que pueden participar múltiples moléculas de hidroxiapatita en el centro de afinidad convergencia (Imagen 42), lo que genera información sobre el papel de este ensamble oligomérico cíclico como un complejo reclutador y posiblemente nucleador de formaciones organizadas y de mayor tamaño de hidroxiapatita.

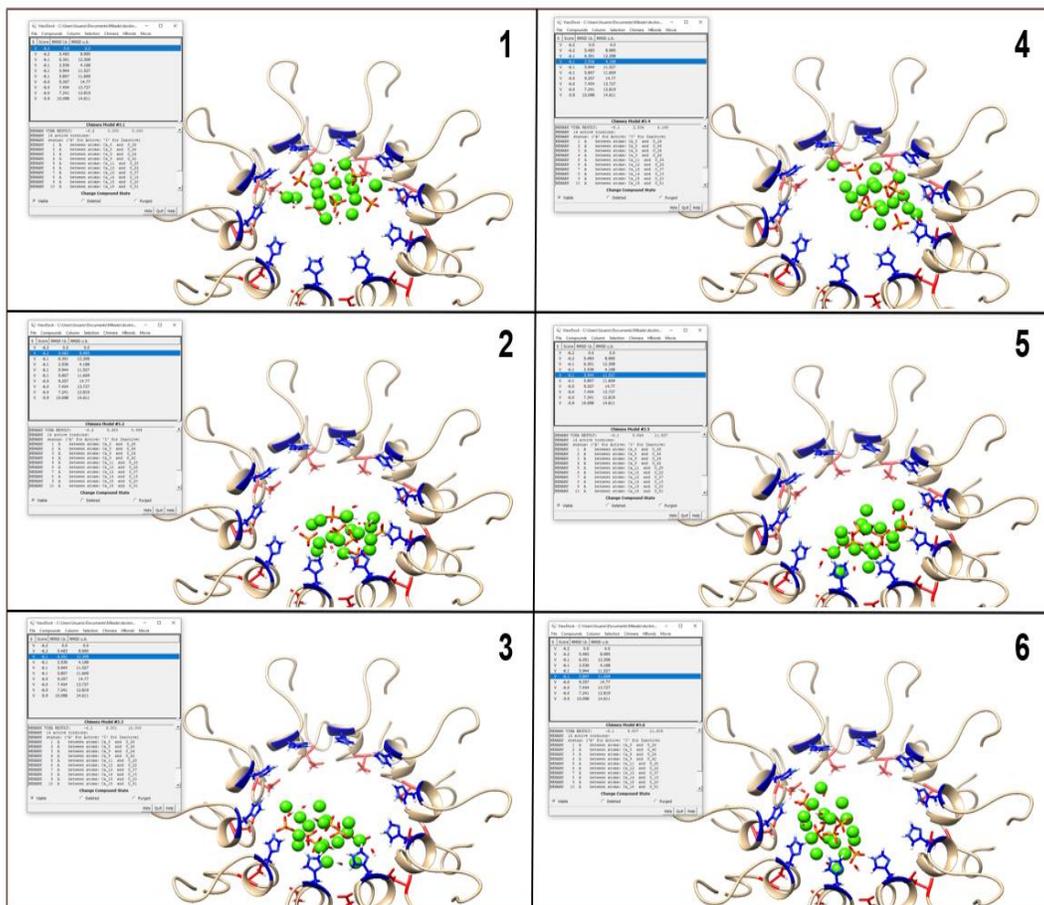


Imagen 41. Acoplamiento de Hidroxiapatita en diversos sitios del Ensamble oligomérico cíclico. Se observa el sitio en común de unión de la cara cristalina 2-0-0 de la hidroxiapatita la cual interactúa con los aminoácidos Histidina (azul) y Ácido Aspártico (rojo).

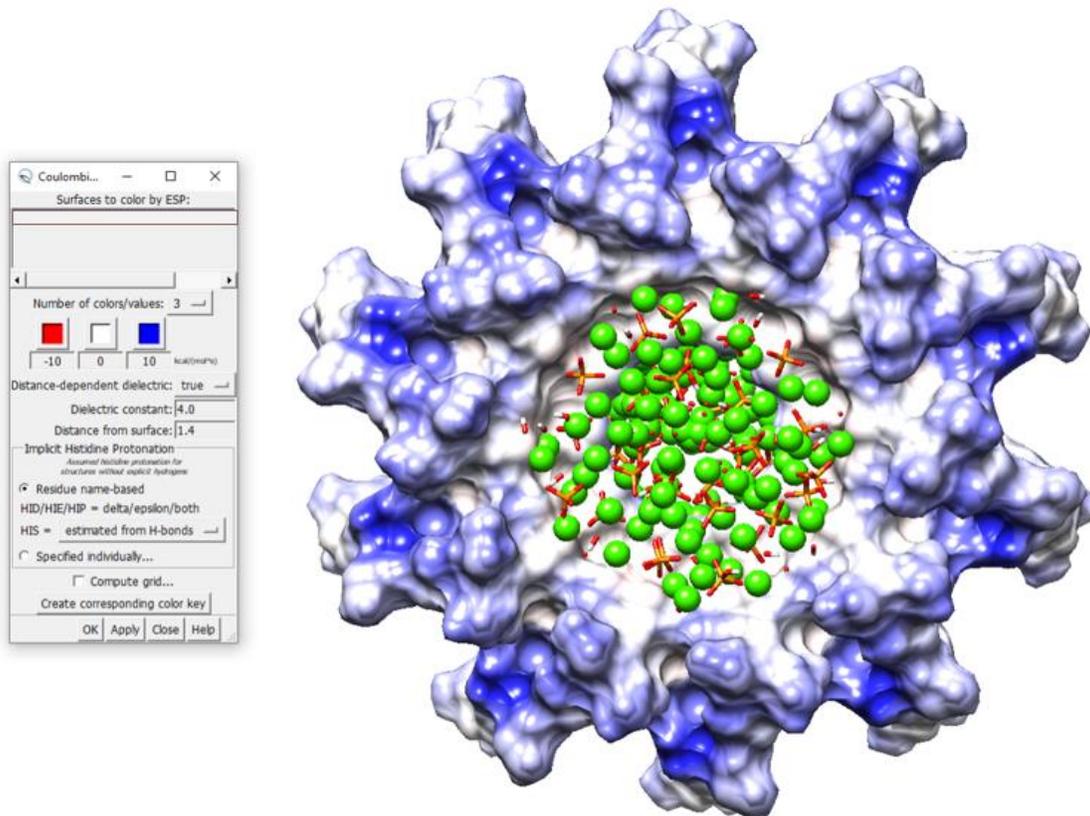


Imagen 42. Modelo de acceso a solubilidad solvente del ensamble oligomérico cíclico de pCEMP1. Se observa el acoplamiento de múltiples moléculas de Hidroxiapatita en diversos sitios del ensamble oligomérico cíclico, donde el sitio central de acoplamiento de la cara cristalina 2-0-0 de la hidroxiapatita es el centro del complejo peptídico.

Partiendo de la premisa del potencial reclutador del ensamble oligomérico cíclico de pCEMP1, se exploró la capacidad que este ensamble reclutador tendría si este interactúa con estructuras cíclicas de su misma especie, tomando en cuenta los resultados de los experimentos de DLS en los cuales, se obtuvo información que indica la formación de complejos peptídicos de dimensiones que podrían ser explicadas por la interacción de estos complejos, teniendo como hipótesis, que, si el ensamble oligomérico cíclico de pCEMP1 tiene capacidad reclutadora de calcio, fosfato e hidroxiapatita, entonces, la asociación de múltiples ensambles oligoméricos cíclicos de pCEMP1 aumentaría esta capacidad reclutadora y podrían tener un papel reclutador y direccionador del crecimiento de estructuras de dimensiones superiores a las que interactúan en el núcleo reclutador del ensamble oligomérico cíclico de pCEMP1.

Para comenzar a explorar esta hipótesis, se empleó el análisis de modelos de accesibilidad solvente del ensamble oligomérico cíclico de pCEMP1, en el cual, la asociación de cargas entre complejos permite ciertos tipos de ensamblajes macroestructurales que son posibles gracias a la afinidad de carga (Imagen 43 y 44). Estos ensamblajes de complejos oligoméricos cíclicos de pCEMP1 resultan en posiciones y combinaciones casi infinitas, ya que, dependiendo de la proyección analizada y posición, estas crean la gran variabilidad de combinaciones y posibilidades (Imagen 43). Sin embargo, existe una restricción que disminuye el número de combinaciones entre acomodo espacial entre complejos y esta es la estereoquímica de los complejos, este impedimento físico se basa en que existen acomodos espaciales que ayudan a que los complejos sean más estables energéticamente, que los mismos optimicen el espacio que están utilizando y que el núcleo reclutador de calcio, fosfato e hidroxiapatita quede libre (imagen 44).

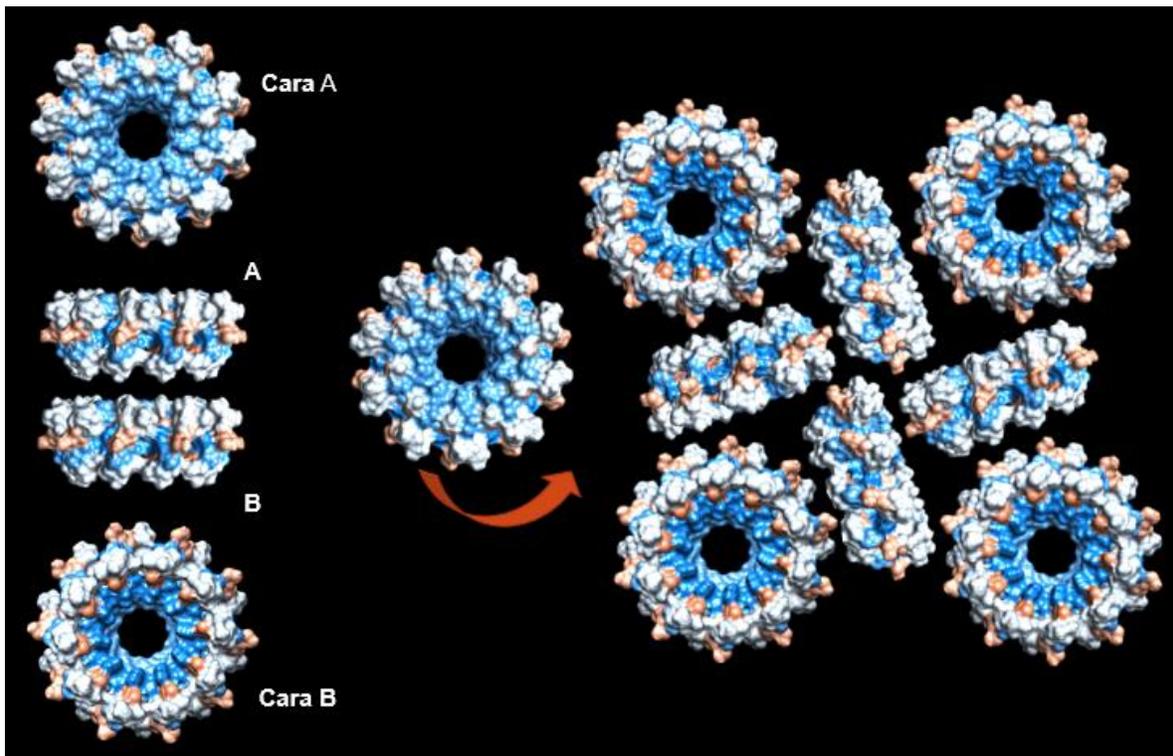


Imagen 43. Variantes de posibles ensamblajes entre complejos peptídicos de pCEMP1. Se observa la asignación de caras con relación a su carga y como estas pueden asociarse entre sí. En la imagen se observa que, a pesar de las cargas y su capacidad de afinidad entre complejos, violan principios estereoquímicos y de posicionamiento espacial, específicamente con el bloqueo del centro reclutador de calcio, fosfato e hidroxiapatita del mismo ensamble oligomérico cíclico de pCEMP1.

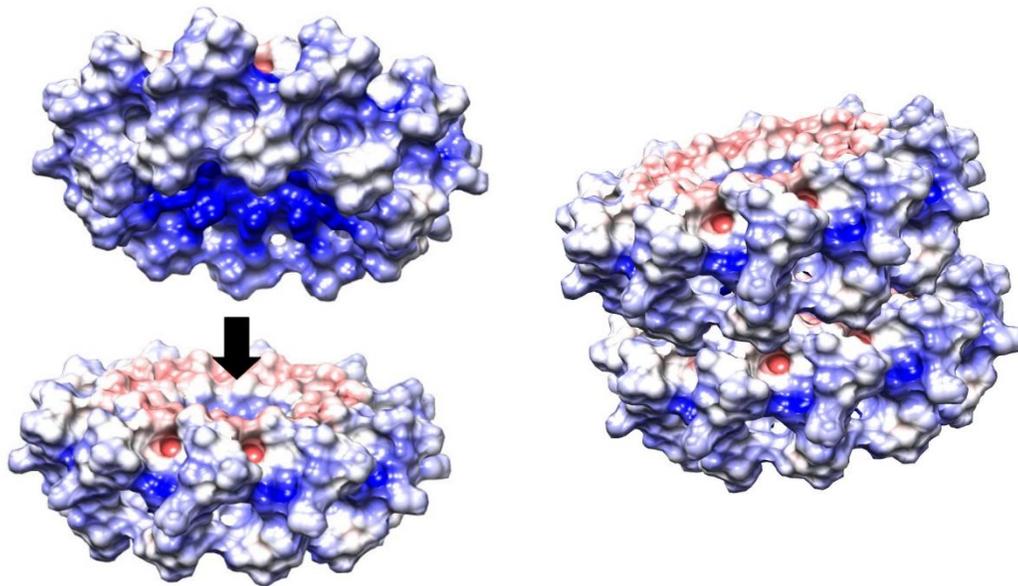


Imagen 44. Modelos de accesibilidad solvente del ensamble oligomérico cíclico de pCEMP1. Se observa un tipo de asociación entre complejos que cumple con las características de relación carga en superficie, optimización de espacio y paso libre en el centro reclutador de calcio, fosfato e hidroxiapatita de los complejos.

La característica de asociación entre los ensamblajes oligoméricos cíclicos de pCEMP1 que cumplen con las características de acoplamiento por carga, optimización espacial y que permiten la no oclusión del centro reclutador del complejo, tienen una propiedad muy importante, la cual radica en que, dependiendo de la cantidad de complejos que se encuentren en el medio, pueden tener un crecimiento geométrico hexagonal (imagen 45) que puede crecer multidireccionalmente e infinitamente (Imagen 46) siempre y cuando exista pCEMP1 en el medio, dando como resultado la obtención de oligómeros de diversas dimensiones, los cuales, pueden explicar los resultados en los experimentos de DLS, donde, los dos picos que se obtuvieron corresponden a 203.7 nm (Pico 1), el cual, podría estar formado por 40.9 ensamblajes oligoméricos cíclicos de pCEMP1, mientras que el segundo pico de 5403 nm (Pico 2) estaría formado por 1102.6 ensamblajes oligoméricos cíclicos de pCEMP1.

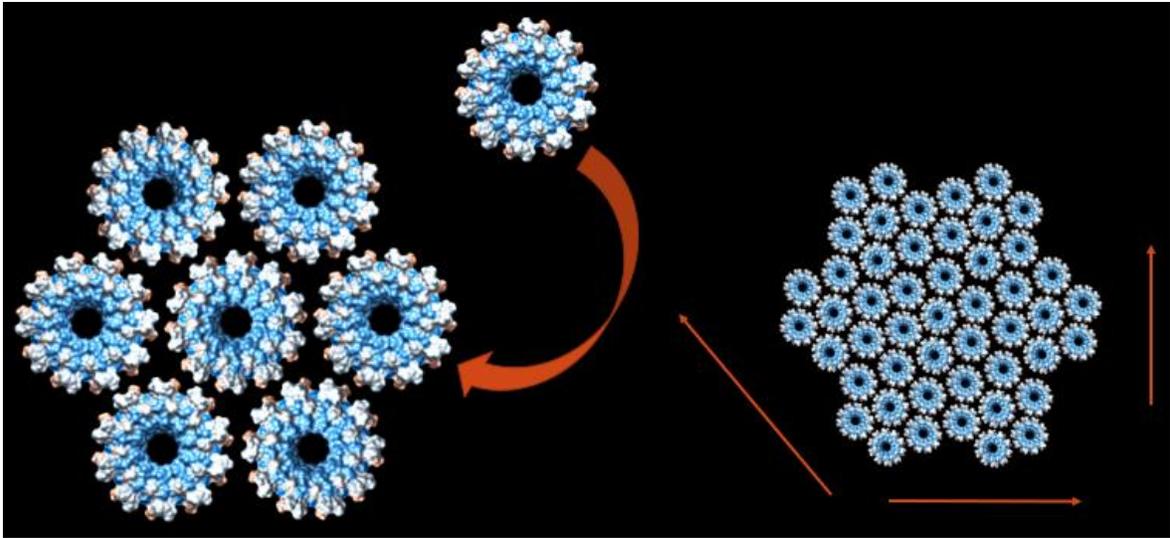


Imagen 45. Crecimiento multidireccional geométrico hexagonal de los ensambles oligoméricos cíclicos de pCEMP1

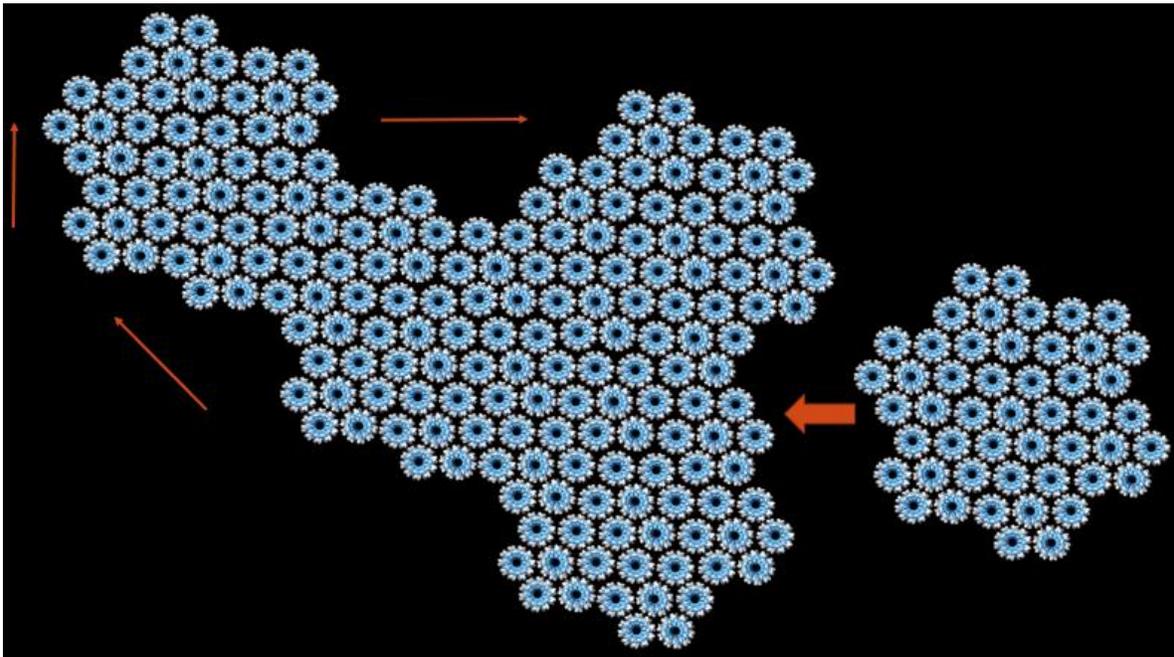


Imagen 46. Crecimiento multidireccional geométrico hexagonal de los ensambles oligoméricos cíclicos de pCEMP1. El crecimiento puede ser indefinido mientras se encuentren moléculas de pCEMP1 en el medio.

Finalmente se exploró el potencial que estos complejos podrían tener sobre la formación de macroestructuras minerales, ya que, la disposición de los ensamblajes oligoméricos de pCEMP1 permite que los centros reclutadores de calcio, fosfato e hidroxiapatita se conviertan en una estructura similar a la de un “túnel” la cual permite un nuevo centro de mayor capacidad reclutadora de iones minerales y que estarían formando proyecciones minerales de hidroxiapatita (Imagen 47).

Además, los centros reclutadores de calcio de los complejos, fosfato e hidroxiapatita, permiten hipotetizar una posible respuesta asociada a la función biológica del péptido *in vitro* asociada a formación de cristales minerales de hidroxiapatita, teniendo a los centros reclutadores como los centros nucleadores de minerales y encargados del direccionamiento y el crecimiento de las estructuras de hidroxiapatita (Imagen 48).

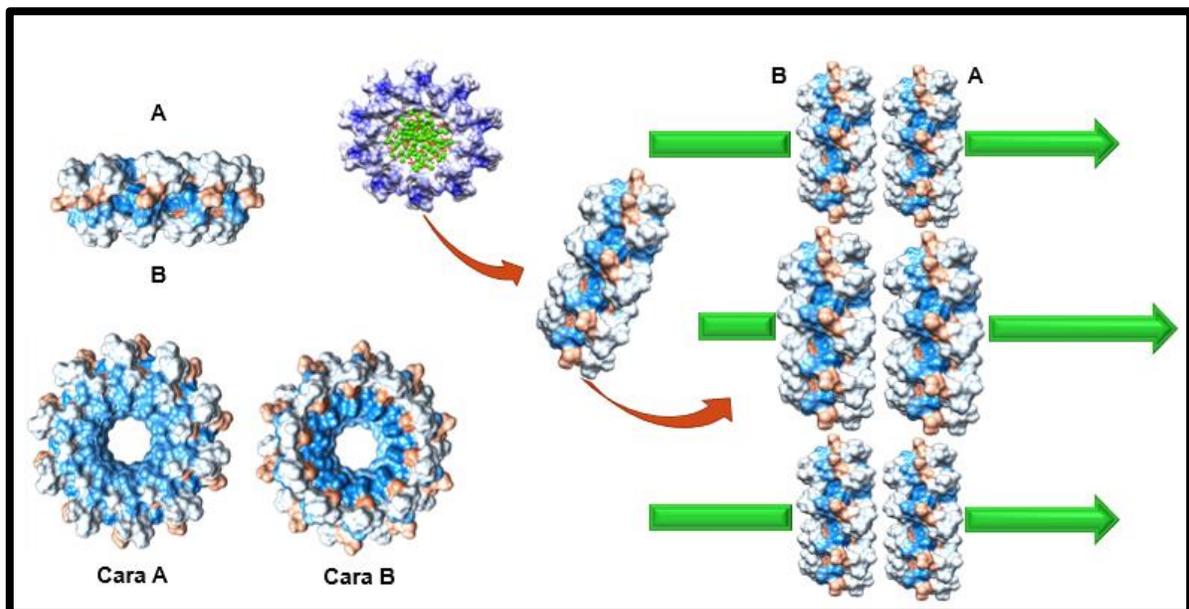


Imagen 47. Modelos de accesibilidad solvente del ensamblaje oligomérico cíclico de pCEMP1. Se observa que la disposición de los ensamblajes permite que los centros reclutadores de calcio, fosfato e hidroxiapatita se conviertan en una estructura tipo “túnel” que permite un mayor reclutamiento de iones minerales y que posiblemente estarían formando proyecciones minerales de hidroxiapatita.

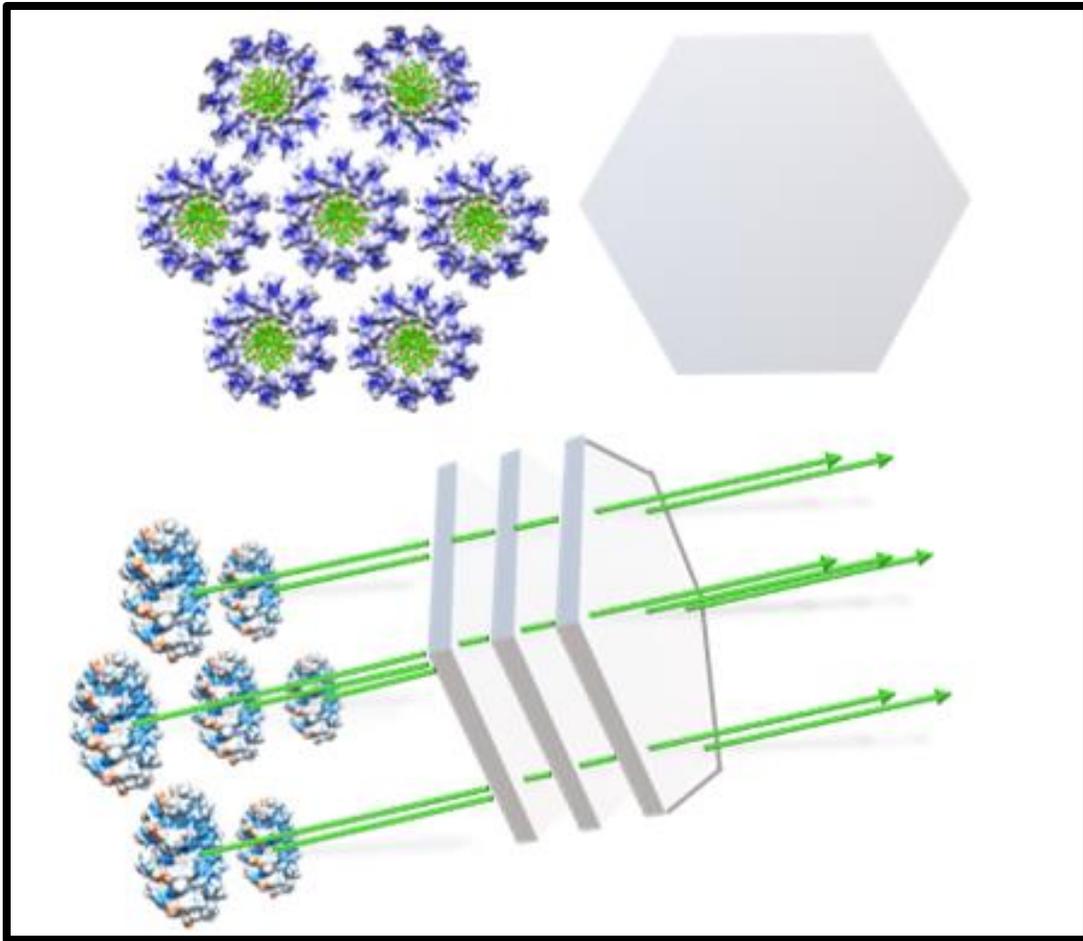


Imagen 48. A. Modelos de accesibilidad solvente del ensamble oligomérico cíclico hexagonal de pCEMP1. Se observa que la disposición de los ensambles y sus centros reclutadores de calcio, fosfato e hidroxiapatita permiten la proyecciones de hidroxiapatita.

Análisis de actividad biológica *in vitro*. Interacción entre pCEMP1 e Hidroxiapatita en la formación de cristales de hidroxiapatita.

Formación de cristales de hidroxiapatita

Para comprobar el potencial biológico de pCEMP1 en el crecimiento de cristales de hidroxiapatita, se empleó el sistema de contradifusión en gel de silicato, con el cual se obtuvieron múltiples estructuras esféricas del orden de los 400 μm de diámetro, estos presentan estructuras tipo drusa que emergen de un centro de nucleación (Imagen 49).

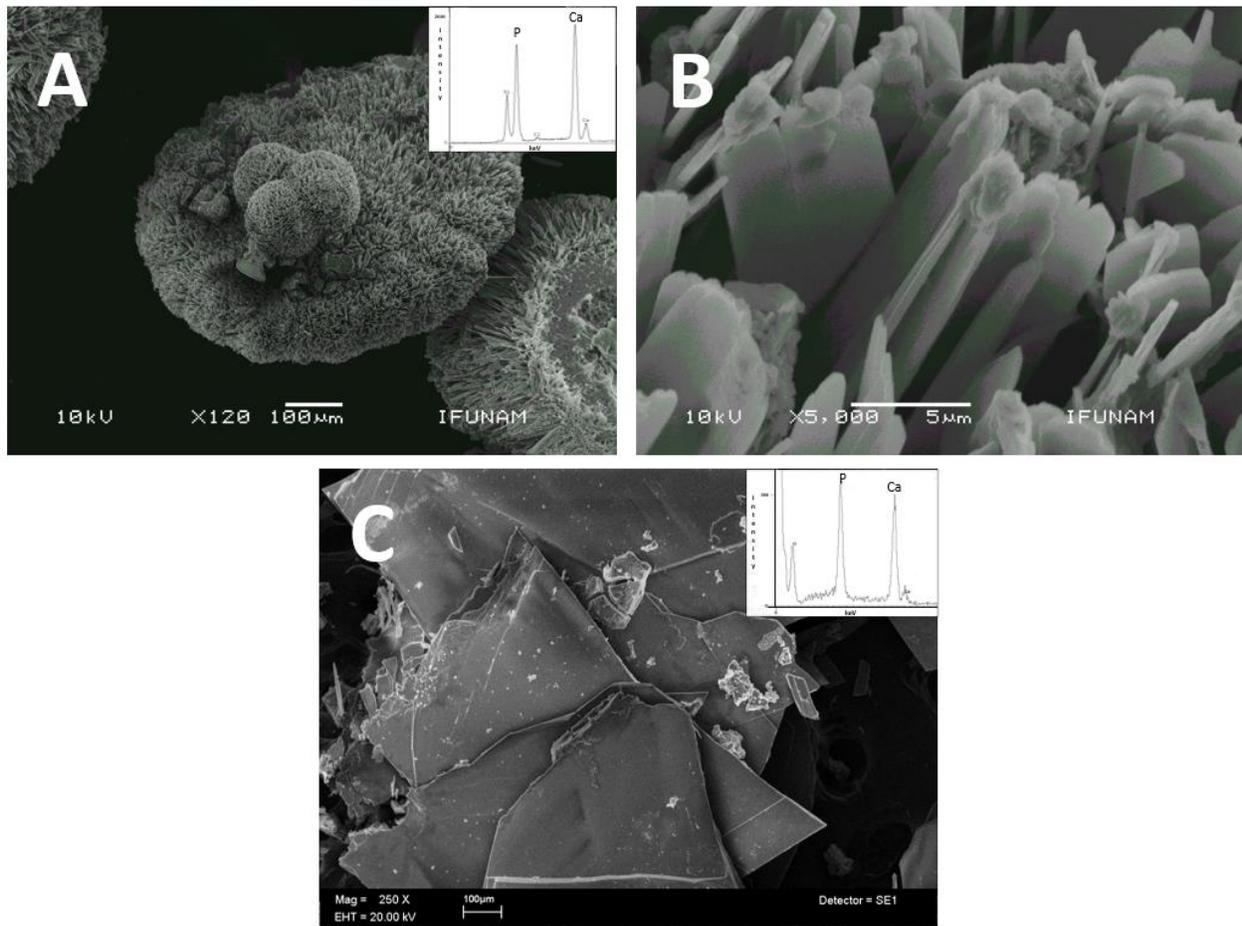


Imagen 49. A. Formación de esferoides del orden de los 400 μm de diámetro a los 7 días de incubación. Relación Ca/P = 1.68 obtenida por EDS correspondiente a la fase mineral de Hidroxiapatita. B. Detalle de la superficie de la estructura de la imagen A, donde se observan las prolongaciones que emergen del centro del esferoide. C. Control con proteína no mineralizante BSA, se observa la ausencia de formación de estructuras esféricas. Relación Ca/P = 1.05 obtenida por EDS correspondiente a la fase mineral de Fosfato dicálcico.

Caracterización de cristales inducidos con pCEMP1

Para determinar de manera exacta la fase mineral de las estructuras esféricas formadas en el sistema de contradifusión de gel de silicato, se decidió someter a las muestras al análisis mediante Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM).

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

Se hizo el análisis de los cristales inducidos con pCEMP1 de 10 días de incubación (Imagen 50). En este análisis se logró determinar que las estructuras obtenidas corresponden a la fase mineral de hidroxiapatita.

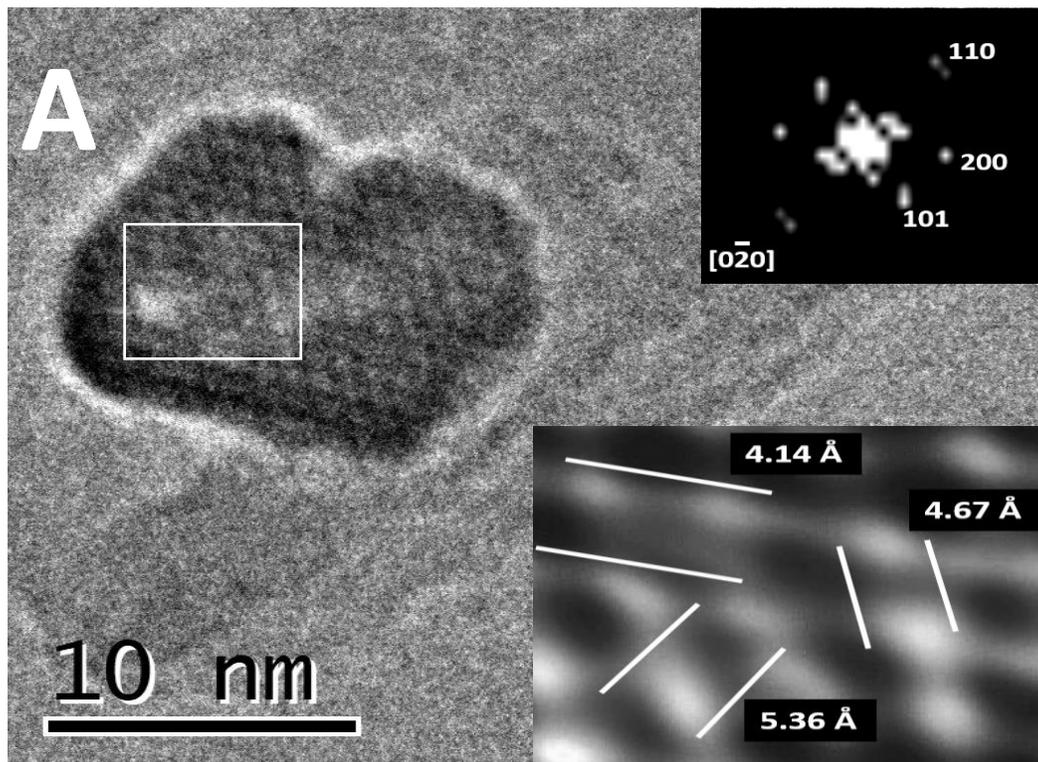


Imagen 50. (A) Plano cristalino de la muestra de 10 días inducida con pCEMP1. En la parte superior derecha de la imagen (A) se muestran los planos cristalinos (200 y 111) obtenidos mediante transformada rápida de Fourier. En la parte inferior derecha se observa la zona de alta resolución en la cual se aprecian las distancias interplanares (4.14, 4.67 y 5.36 Å) correspondientes a la fase mineral de hidroxiapatita.

Incubación de cristales de Hidroxiapatita con pCEMP1

El resultado obtenido tras la incubación de los cristales de hidroxiapatita con pCEMP1 fue una disminución de la concentración del péptido en la solución, empezando con una concentración inicial de 1mg/ml tras 24 horas de incubación a 37 °C y después de llevar a cabo una nueva cuantificación de la concentración mediante espectrometría por el método de Bradford, se obtuvo una concentración de 0.266 mg/ml en el tubo experimental (Imagen 51), cabe mencionar que el volumen total no tuvo cambios manteniéndose en 400µl volumen total. El resultado obtenido hace hipotetizar que la pérdida en la cuantificación de pCEMP1 en la solución de incubación se debió a una posible adsorción en la superficie de los esferoides de hidroxiapatita.

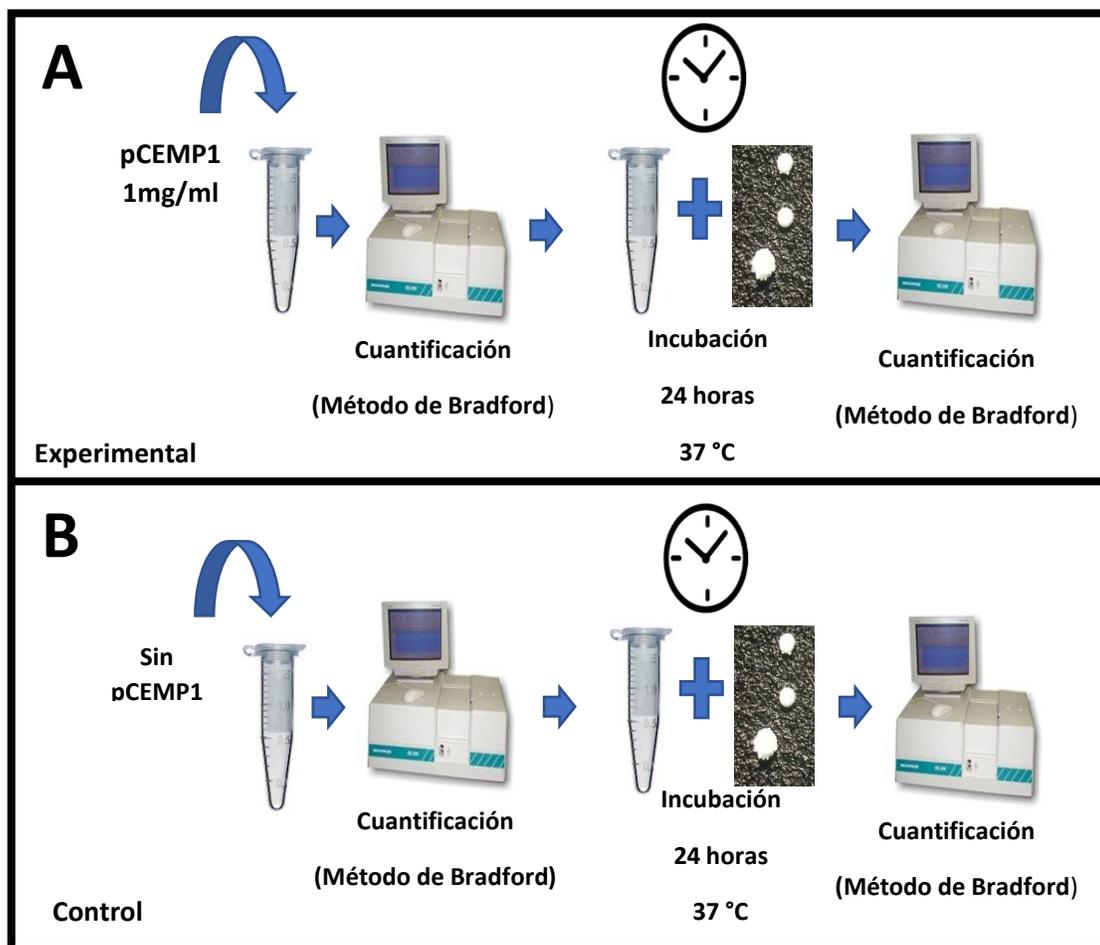


Imagen 51. Diagrama representativo del proceso de incubación de cristales de Hidroxiapatita con pCEMP1 y cuantificación de su concentración de péptido. A) Experimental con pCEMP1. B) Control sin pCEMP1.

Análisis del crecimiento de los cristales de Hidroxiapatita tratados superficialmente con pCEMP1 como reclutador de Calcio

Para dilucidar lo que sucede cuando se incubaba pCEMP1 en interacción con Hidroxiapatita y el por qué la concentración de péptido disminuye en la solución de incubación, se llevó a cabo un análisis de fluorescencia a las estructuras de Hidroxiapatita para saber si la disminución de concentración se debía a la adsorción de pCEMP1 en la superficie de los esferoides. Con la hipótesis de la asociación entre moléculas de pCEMP1, Hidroxiapatita y calcio, el seguimiento de un acumulo de calcio que se vería reflejado en aumento de fluorescencia sería la respuesta a estas indagatorias. Como resultado se obtuvo una constante de emisión de fluorescencia en el grupo control (Imagen 52 A y Gráfica 1 A), el cual se caracterizó por la ausencia de incubación de esferoides de Hidroxiapatita con pCEMP1.

La emisión de fluorescencia se mantiene constante y no hay aumentos significativos, por ende, se concluye que la ausencia de incremento de fluorescencia está relacionada con el no emplear pCEMP1 en la incubación. Contrastando este resultado del grupo control tenemos al experimental, el cual tenía como característica la incubación de la estructura de hidroxiapatita con una solución de pCEMP1. Puede observarse un aumento en la emisión de la fluorescencia que incrementa gradualmente con el paso del tiempo desde los 0 y hasta los 270 minutos (Imagen 52 B y Gráfica 1 B). Por lo tanto, este resultado indica que, al existir mayor fluorescencia, la cual deriva del reclutamiento de calcio que se une al reactivo Fluo-4 y que es capaz de emitir fluorescencia cuando se une a este en un constante intercambio iónico (Ejemplo: Unido a una molécula), podemos deducir que pCEMP1 podría ser la molécula que permite el intercambio iónico, reclutamiento de calcio y, por ende, crecimiento del cristal de hidroxiapatita y su emisión de Fluorescencia creciente.

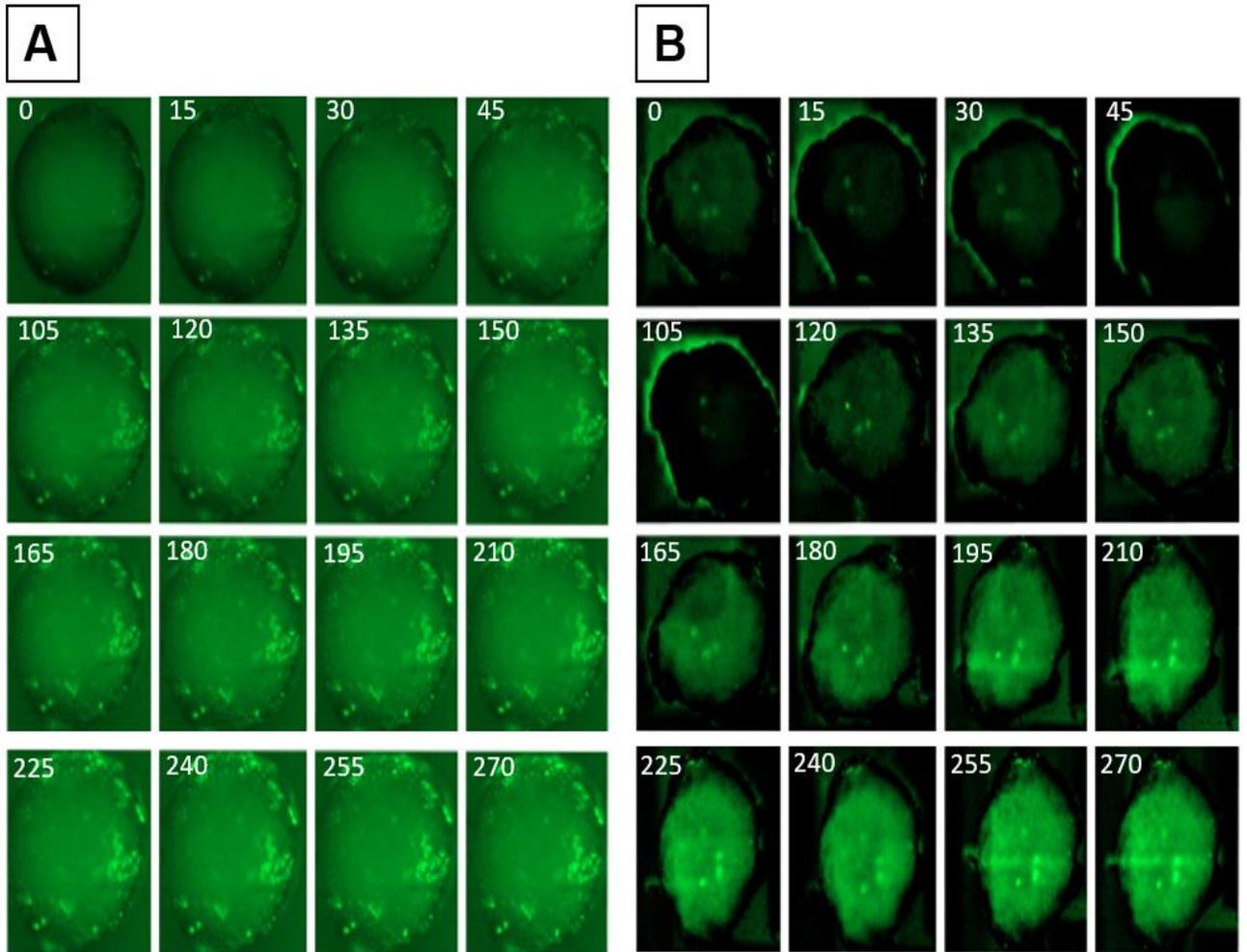
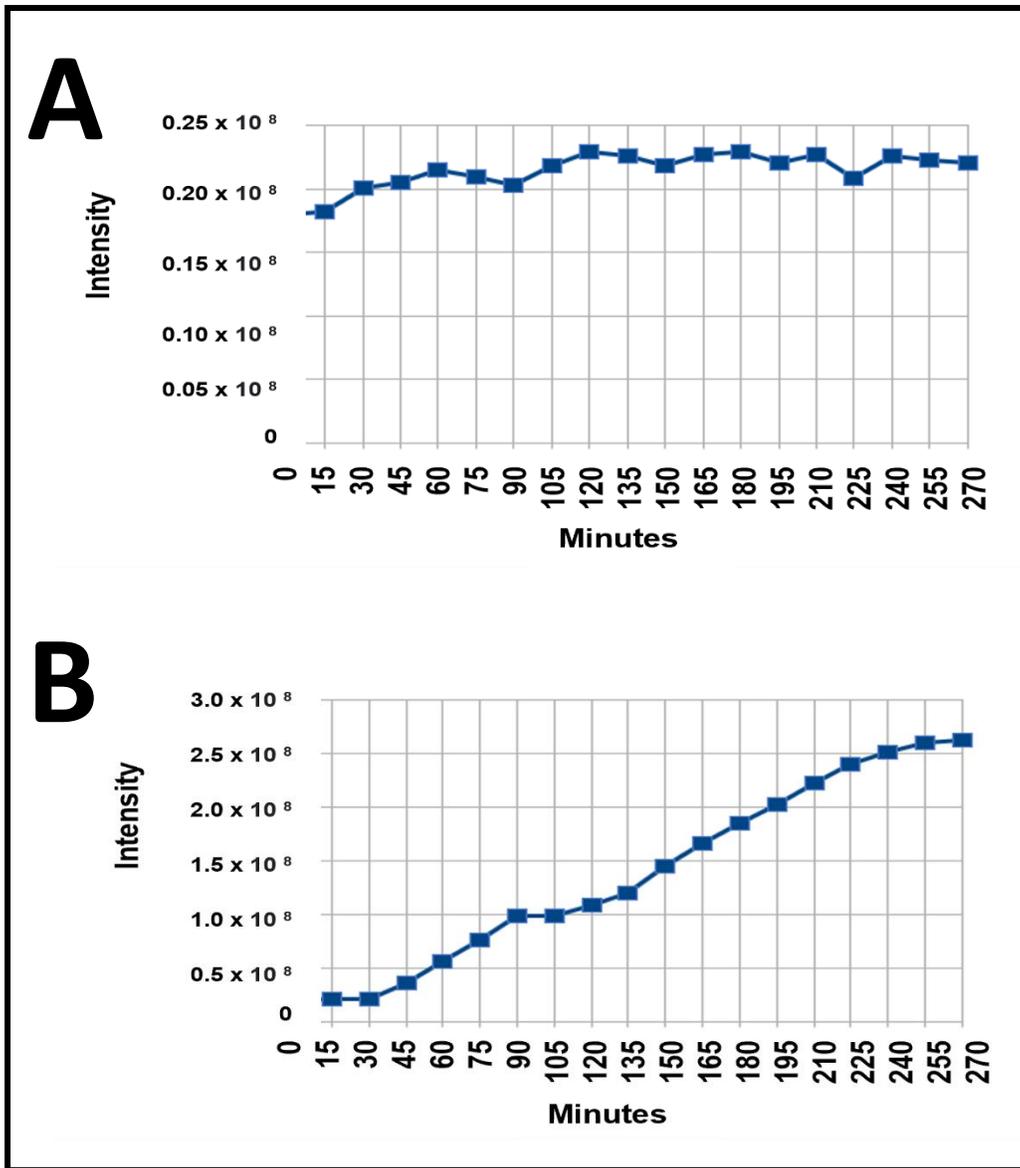


Imagen 52. Análisis de la interacción de calcio con hidroxiapatita. Emisión de fluorescencia en relación con el tiempo (minutos). A) Cristal de hidroxiapatita sin péptido, puede notarse una emisión de fluorescencia. que se mantiene constante desde el tiempo 0 hasta los 270 min. B) Cristal de hidroxiapatita con pCEMP1 adsorbido en la superficie; puede notarse que a partir del tiempo 0 hasta los 270 min la emisión de fluorescencia aumenta gradualmente, probando así que pCEMP1 tiene un papel fundamental en el reclutamiento de calcio hacia la estructura de hidroxiapatita. Debido a la intensidad de fluorescencia emitida se empleó una supresión en la misma para poder observar el incremento de emisiones.



Gráfica 1. Los resultados de las emisiones iniciales son muy aproximados entre ambos grupos, la diferencia comienza a partir del inicio de la adición de calcio. Es muy probable que la diferencia inicial de fluorescencia pueda estar relacionada con la superficie tratada con pCEMP 1, por lo tanto, la cantidad de calcio expuesto al medio es menor al que puede interactuar con el reactivo fluorescente. A) Intensidad de fluorescencia control (Cristales de hidroxiapatita sin incubación de pCEMP1, puede notarse una constante en la emisión de fluorescencia. B) Intensidad de fluorescencia experimental, se muestra un aumento gradual de la fluorescencia en un periodo que abarca desde los 0 hasta los 270 minutos.

Los resultados obtenidos indican que al tratar una superficie de Hidroxiapatita con la solución de pCEMP1 se promueve el reclutamiento de iones calcio a la estructura mineral, esto se confirma debido a que la intensidad de la fluorescencia está relacionada con la capacidad del reactivo Fluo-4 AM (Thermo Fisher) para asociarse con iones calcio que estén en procesos de intercambio de electrones, como se ha mencionado en este trabajo, existen interacciones electrostáticas entre los átomos de pCEMP1 y la hidroxiapatita, específicamente con la Serina-19 (átomos de oxígeno y calcio). Arginina-14 (hidrógeno y oxígeno del grupo fosfato de HA) y Arginina-14 (hidrógeno y oxígeno del grupo hidroxilo de HA) Oxígeno de Glutamina-10 y un átomo de calcio de HA y Oxígeno del ácido aspártico-7 y un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo HA.

Además, es posible que las interacciones hidrofóbicas del péptido promuevan que los grupos de moléculas peptídicas puedan tener tres tipos de interacción, las cuales serían iónicas (calcio del medio) e intermoleculares (péptido-péptido, péptido-hidroxiapatita). De esta forma estas asociaciones permiten que los iones calcio se aglomeren en las superficies adsorbidas de hidroxiapatita con pCEMP1, promoviendo así el aumento de la fluorescencia, la cual puede ser monitoreada visual (Imagen 52) y gráficamente (Gráfica 1) por el incremento de la emisión de la fluorescencia desde los 0 y hasta los 270 minutos.

DISCUSIÓN

Actualmente se encuentran pocos estudios relacionados con las características estructurales y bioquímicas de proteínas asociadas a procesos de mineralización, particularmente, no hay antecedentes de análisis estructurales del péptido derivado de la Proteína del Cemento 1 (pCEMP1), debido a la carencia de homólogos estructurales significativos resueltos a nivel tridimensional. (Romo, 2016)

El objetivo principal de este proyecto fue generar un modelo experimental tridimensional de pCEMP1 que permita conocer cómo este péptido lleva a cabo su función biológica asociada a biomineralización (formación de cristales de hidroxiapatita, e interacción a nivel celular).

La síntesis de péptidos mediante la técnica de fase sólida FMOC/tBu como una estrategia de optimización de tiempo y recursos económicos es una herramienta que ha demostrado eficacia para el estudio estructural y actividad biológica de péptidos derivados de proteínas involucradas en el proceso de biomineralización, como es el caso de la BMP-2 (Jingfeng *et al*, 2010). Nuestro trabajo es el primero en reportar la estructura tridimensional de una región derivada de la proteína del cemento 1; esto establece el primer dato de estructura tridimensional experimental derivado de una de las proteínas específicas del cemento radicular humano (CEMP-1). Además, reportamos por primera vez información experimental del mecanismo de acción biológica del péptido, su interacción con hidroxiapatita probado sin el empleo de mecanismos de unión sintéticos (columnas de purificación de intercambio iónico con fase inmóvil de hidroxiapatita (Romo, 2016)) y reclutamiento de iones de calcio y comportamiento en solución.

Una de las teorías que se manejaban sobre el plegamiento de péptidos y proteínas es que se depende no solo de la estructura primaria, sino de la interacción con moléculas y iones del medio para establecer su conformación tridimensional. Nosotros demostramos que la carga iónica generada por gradientes de CaCl_2 en solución no es capaz de modificar el plegamiento de esta biomolécula, contrario a estudios que indican los cambios conformacionales de proteínas y péptidos relacionada con la incorporación de sales al medio (Kazumasa *et al*, 2001).

La técnica espectroscópica de DC ayuda a comprender cual es la morfología que opta por tener una biomolécula en solución, en nuestro caso, los resultados de DC indican que pCEMP1 no presenta estructuración de plegamiento cuando se encuentra en una solución acuosa sin iones como aditivos o en solución con alta carga iónica como lo son aquellos con altas concentraciones de ClCa_2 (200mM). pCEMP1 a una concentración de 50% de TFE genera espectros de DC muy característicos de una proteína plegada, debido a que este aditivo promueve la formación de estructura secundaria. Esta técnica de adición de TFE ha sido descrita antes como una alternativa con validez científica para el estudio estructural y de comportamiento de proteínas, teniendo validez tal que hace que estos modelos generados con inducción de plegamiento mediante el empleo de TFE resultan en estructuras depositadas y consultables en el PDB. (Buck, 1993; Povey, 2006; Abdur, 2017). Además, el TFE se usa comúnmente para imitar interacciones de largo alcance dentro de estructuras de proteínas; estudios han demostrado que el plegamiento de secuencias de aminoácidos dentro una proteína está influenciada por el entorno que la rodea. (MacPhee, 1997).

Teniendo como resultados las condiciones necesarias para promover el plegamiento de pCEMP1 se procedió a realizar los espectros 1D y 2D TOCSY y ROESY, los cuales fueron de una calidad óptima para elaborar los cálculos necesarios para la construcción del modelo experimental 3D. Con el empleo de 20 estructuras que contaran con valores de energía bajos y que no presentaran violaciones y un ajuste del modelo obtenido por dinámica molecular, la estructura final arrojó un RMSD (Root-mean-square deviation of atomic positions) de 0,39 (Deben ser menor a 1.0 para ser válidos). Además, el gráfico de Ramachandran (Ramachandran *et al*, 1963) el cual se enfoca en analizar todas las combinaciones de ángulos diédricos ψ y ϕ en biomoléculas como proteínas y péptidos, los cuales son de importancia para permitir una aproximación de la estructura secundaria, debido a que existen combinaciones típicas de ángulos para hélices α y hojas β . Podemos identificar que el 43.4% de los pares de los ángulos diedros se localizan en la región denominada más favorable, mientras que el 56.6% está localizada en la región adicionalmente permitida. Estos datos entran dentro del rango de información y resultados necesarios para que una biomolécula 3D pueda ser validada, creíble y que demuestre que la metodología planteada fue correcta y bien elaborada. (www.wwpdb.org/validation/2017/NMRValidationReportHelp).

A partir de los modelos teóricos generados con el servidor informático I-TASSER para realizar la construcción de modelos teóricos de pCEMP1 y de hrCEMP-1 para ser comparados con el modelo experimental de pCEMP1 mediante el software UCSF Chimera (Gasteiger *et al*, 2005; Zhang, 2008) y PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC). El análisis de las estructuras tiene como principal similitud la conformación de estructura secundaria en los cuales la hélice α (30%) está conformada por los residuos SQQAGH que corresponden a la posición 8, 9, 10, 11, 12 y 13 en la secuencia del péptido y de la proteína recombinante.

Las simulaciones de acoplamiento molecular entre las moléculas minerales involucradas en la formación de hueso, cemento radicular y dentina, como la hidroxiapatita con pCEMP1 demuestran que la carga presente en la superficie y la disposición del área del péptido permiten el acoplamiento entre la molécula de hidroxiapatita con pCEMP1 y sus interacciones con aminoácidos que conforman al péptido.

La constante de afinidad de diversos residuos de aminoácidos hacia la hidroxiapatita ha sido reportada (Tavafoghi, 2016) y se puede notar que pCEMP1 está compuesto por aminoácidos de alta afinidad a hidroxiapatita. Es conocido que las proteínas no colágenas asociadas al proceso de mineralización como osteopontina (OPN), sialoproteína ósea de unión a integrina (IBSP), la fosfoproteína ácida de matriz de dentina 1 (DMP1) y la fosfoproteína de dentina (DSPP) son ricas en aminoácidos cargados y fosfoserina; estos residuos de aminoácidos controlan la nucleación de hidroxiapatita y su crecimiento. (Rautaray, 2005).

Sin embargo, no todos los residuos de aminoácidos en pCEMP1 muestran interacción con la superficie de hidroxiapatita, en el análisis de acoplamiento molecular, es relevante porque el ácido aspártico (7) y la serina (19) tienen altas tasas de adsorción a la hidroxiapatita y pueden controlar la interacción entre péptidos o proteínas a este mineral (Christensen, 2020, Suzuki, 2012; Tavafoghi, 2016).

Aunque los valores de adsorción reportados para glutamina (10) y arginina (14) no son altos, el aporte de ácido aspártico y los residuos de serina son suficientes para estabilizar la interacción, como se informó anteriormente. (Tavafoghi, 2016; Rautaray, 2005). Este comportamiento de interacción fue confirmado por nuestros resultados de las pruebas de unión pCEMP, en las que confirmamos la afinidad de pCEMP1 al cristal de hidroxiapatita.

Por otro lado, los residuos de serina que no están asociados con la interacción inicial con la superficie de hidroxiapatita probablemente se involucren con la atracción de Ca^{2+} y por lo tanto aumentar la sobresaturación de estos iones, promover y dirigir el crecimiento de nuevos cristales de hidroxiapatita (Palazzo, 2009; Koutsopoulos, 2000)

El reclutamiento de calcio y los experimentos de crecimiento de cristales de hidroxiapatita demostraron que los aminoácidos que no interactúan con la hidroxiapatita dirigen la atracción de los iones de calcio para aumentar el tamaño del cristal (Imagen 52).

Además, el modelo tridimensional experimental de pCEMP1 acoplado con hidroxiapatita podría fomentar reclutamiento de iones calcio y fosfato, y uniones intermoleculares péptido-péptido y péptido-hidroxiapatita, esto genera la hipótesis de que pCEMP1 empleado como terapia contra los efectos de la osteoporosis inducida en ratas Wistar estaría más relacionado con el reclutamiento de calcio que con la activación de alguna vía de señalización por acople a receptores tipo $\text{TGF}\beta$ o BMP (Salgado; 2017).

El tener al modelo tridimensional experimental de pCEMP1 permitió explorar múltiples asociaciones peptídicas que ayudaron a explorar la actividad biológica asociada a crecimiento de cristales de hidroxiapatita, esto basándonos en los estudios de docking simétrico (André, 2007) molecular proteína-proteína de cuerpo rígido, en los cuales, los principios radican en la capacidad de las proteínas y péptidos con actividad biológica tienden a organizarse en formas simétricas con valores entrópica, entálpica y estereoquímica que proveen estabilidad a un complejo. El complejo peptídico de pCEMP1 ayudó a dar explicación a las hipótesis de centros peptídicos nucleadores del crecimiento mineral de la hidroxiapatita, esto debido a la afinidad de carga de los complejos para agruparse y formar estructuras tipo “túnel” que fomentan un mayor reclutamiento de calcio y fosfato, que, con el paso del tiempo y bajo condiciones específicas, formarán hidroxiapatita.

Mediante el empleo de estudios de DLS demostramos que pCEMP1 en solución cursa por estados de polidispersidad y monodispersidad. Esta organización entre moléculas podría formar aglomerados sobre hidroxiapatita fomentados por las características de parcialidad hidrofóbica de la superficie del péptido y por los antecedentes que se tienen de la afinidad de la proteína CEMP1 en procesos de purificación de esta proteína empleando hidroxiapatita como fase estacionaria (Tiselius, 1956; Montoya *et al*, 2015; Romo *et al*, 2016).

Además, gracias a los análisis de los complejos peptídicos de pCEMP1 se pudo asociar el tamaño de estos grupos peptídicos en solución con la unión y formación de macrocomplejos basados en los complejos peptídicos de pCEMP1, ya que, los dos picos que se obtuvieron corresponden a 203.7 nm (Pico 1), el cual, podría estar formado por 40.9 ensamblajes oligoméricos cíclicos de pCEMP1, mientras que el segundo pico de 5403 nm (Pico 2) estaría formado por 1102.6 ensamblajes oligoméricos cíclicos de pCEMP1.

La característica de asociación entre los ensamblajes oligoméricos cíclicos de pCEMP1 que cumplen con las características de acoplamiento por carga, optimización espacial y que permiten la no oclusión del centro reclutador del complejo, tienen una propiedad muy importante, la cual radica en que, dependiendo de la cantidad de complejos que se encuentren en el medio, pueden tener un crecimiento geométrico hexagonal que puede crecer multidireccionalmente e infinitamente siempre y cuando exista pCEMP1 en el medio, dando como resultado la obtención

Los principios de termodinámica dictan que cuando un sistema termodinámicamente es de forma cambiante, una mayor temperatura genera un mayor movimiento molecular, lo que produce la excitabilidad de moléculas la cual es un producto directo de la transferencia de energía térmica, esta es equivalente a inestabilidad entre enlaces moleculares, todo esto derivará en la formación inestable de enlaces débiles como lo son las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno, por ende, tendrá como resultado un plegamiento con baja resistencia a altas temperaturas (Streeter *et al*, 2000), en el caso de los complejos peptídicos de pCEMP1 demostramos que el plegamiento que adquiere a temperaturas de 37 °C en los experimentos de DLS indican su efectividad en términos de estabilidad entre enlaces moleculares. Esto tiene mucho sentido debido a que es de esperarse ver este tipo de comportamientos en biomoléculas que derivan de organismos que dependen de esas condiciones fisicoquímicas para su desarrollo y actividad biológica, como es el caso de las

proteínas cemento específicas derivadas de mamíferos, los cuales tienen condiciones fisicoquímicas muy similares. Por ende, demostramos por primera vez que nuestro péptido sintético tiene esta característica que mimetiza las cualidades de una proteína Humana y recombinante de secuencia completa.

La actividad biológica de pCEMP1 relacionada con la nucleación y crecimiento de cristales de fosfato de calcio (Bonucci, 1992; Silverman, 2004) se demostró empleando el sistema de contradifusión en gel de silicato. pCEMP1 produce estructuras esféricas de un diámetro aproximado de los 200 a 800 μm , conformadas por cristales tipo drusa y crecen desde un centro de nucleación. Los cristales formados son muy similares a las que se han obtenido empleando múltiples proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización (Silverman, 2004; Fan D, et al 2011), especial énfasis con proteínas cemento específica como CEMP-1, hrCEMP-1 y HACD1/CAP (Silverman, 2004; Villareal E, et al 2009; Fan D, et al 2011; Romo, 2016; Nidome, 2018) y con péptidos derivados de CEMP-1 y HACD1/CAP (Correa, 2017). Esto demuestra que nuestro péptido posee la misma característica en cuanto a función biológica que lo reportado asociado a biomineralización de las proteínas nativas y recombinantes en secuencia completa.

Pudimos demostrar que pCEMP1 tiene la capacidad de promover la formación de estructuras de Hidroxiapatita, por ende, esta secuencia de 20 aa (MGTSSTDSQQAGHRCSTSN) podría considerarse como una región de CEMP1 que tiene como finalidad promover este tipo de actividad mineralizante, con especial énfasis en que no existen homólogos de secuencia, teniendo así, un antecedente de una biomolécula sintética derivada de una proteína cemento específica con potencial clínico óseo regenerativo.

Con el empleo de la técnica de HRTEM y para dilucidar si los cristales esféricos eran alguna fase mineral de hidroxiapatita, lo que ayudaría a verificar su actividad biológica y similitud con proteínas asociadas a biomineralización, se confirmó la composición de las estructuras formadas en el sistema de contradifusión de gel de silicato inducidos con pCEMP1, estas se constituyen por hidroxiapatita (PDF#860740) correspondiente a los planos cristalográficos (200) y (111) y que toma mucha relevancia ya que este plano cristalino (200) tiene una gran afinidad por el centro del complejo peptídico de pCEMP1, el cual se demostró que cumple un papel fundamental para el crecimiento de proyecciones de hidroxiapatita y

que explicarían la actividad biológica de pCEMP1 en la formación de cristales de hidroxiapatita. HRTEM provee patrones específicos cuantitativos para cada fase cristalina de una estructura mineral, con los cuales usando la transformada de Fourier se obtienen planos cristalinos, distancias interplanares y con el empleo de tablas internacionales de difracción de polvos (PDF/Powder Diffraction File) se determinó con exactitud la fase mineral de Hidroxiapatita. La información obtenida puede ser relacionada con facilidad a múltiples resultados obtenidos en trabajos experimentales con proteínas involucradas en procesos de mineralización como la amelogenina (hrAMEL) en el cual se obtuvieron cristales de morfología similares a los obtenidos en este trabajo, los cuales son compuestos por fosfato octacálcico, (Lijima, 2002), o como el caso de la proteína de matriz de dentina recombinante (hrDMP1) donde se obtiene la formación de cristales de apatita (He *et al*, 2003), refiriéndonos a proteínas cemento específicas como lo es CEMP-1 nativa (Villarreal *et al*, 2009) y en su forma recombinante (hrCEMP-1) (Romo, 2016), ahora, si hablamos de proteínas involucradas en el proceso de biomineralización obtenidas a partir de la síntesis de fase sólida FMOC/tBu, podemos decir que a diferencia de los estudios de péptidos de la Proteína morfogénica ósea 2 (BMP2), en los cuales se obtienen estructuras minerales pobres en organización, pCEMP1 genera resultados significativamente superiores, de estructura bien organizada y definida (Jingfeng *et al*, 2010).

Finalmente, los resultados obtenidos al tratar una superficie de Hidroxiapatita con la solución de pCEMP1 y analizarlo con fluorescencia, pudimos observar por primera vez como es que se lleva a cabo el reclutamiento de iones calcio a una estructura mineral por fluorescencia mediante el intercambio de electrones, como se ha mencionado en este trabajo, las interacciones electrostáticas de los aminoácidos de pCEMP1 interactúan directamente con el calcio de la hidroxiapatita. Además, es posible que las interacciones hidrofóbicas del péptido promuevan que los grupos de moléculas peptídicas puedan tener tres tipos de interacción, las cuales serían iónicas (calcio del medio) e intermoleculares (péptido-péptido, péptido-hidroxiapatita). De esta forma estas asociaciones permiten que los iones calcio se aglomeren en las superficies adsorbidas de hidroxiapatita con pCEMP1. Esta información podría finalmente dilucidar el mecanismo de acción de pCEMP1 como terapia contra osteoporosis, donde el péptido estaría contrarrestando los efectos de la actividad de osteoclastos alterada por el sistema RANK/RANK-L, mediante la promoción de la deposición de calcio en hueso desmineralizado (Salgado; 2017; Tobeiba, 2020).

CONCLUSIONES

La actividad biológica del péptido de CEMP1 relacionada con la promoción de mineralización radica en la afinidad de esta molécula a formar complejos reclutadores de calcio con la hidroxiapatita, la cual es uno de los componentes principales del hueso.

La actividad biológica de pCEMP-1 relacionada con la promoción de mineralización radica en la capacidad de esta molécula de formar complejos peptídicos.

Los complejos peptídicos de pCEMP-1 tienen una afinidad alta por la Hidroxiapatita. La forma en que los iones calcio y fosfato son reclutados hacia zonas mineralizadas dependen de la presencia del pCEMP-1 como mediador del proceso.

La formación de complejos peptídicos de pCEMP-1 es la respuesta a la actividad biológica asociada a la formación de cristales de hidroxiapatita.

Este trabajo permitió plantear nuevas hipótesis relacionadas al proceso de biomineralización en el cual está involucrado pCEMP1, principalmente la información relacionada con la capacidad de reclutamiento de calcio, sin embargo no se pudo determinar al 100% si esta es la única forma en la que el péptido logra tener actividad favorable en defectos óseos, pues aún falta información relacionada a vías de señalización celular y receptores celulares involucrados en el proceso de biomineralización, específicamente en la activación de osteoblastos.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación son ahora el antecedente primordial que permitirán el estudio de los mecanismos de acción de pCEMP1, pues ahora el punto de partida es el primer modelo tridimensional experimental real de esta biomolécula activa, su depósito en el PDB es ahora un instrumento de consulta y análisis para futuras investigaciones. De este modo se podrá explicar a profundidad cuál es el papel de pCEMP 1 cuando este es empleado como terapéutica contra los defectos óseos provocados por la osteoporosis en ratas ovariectomizadas, por lo ende, podrán en un futuro emplearse en otros modelos biológicos similares.

PERSPECTIVAS

Llevar a cabo un escaneo de alanina con el péptido para conocer si el cambio puntual en los aminoácidos de la secuencia altera la función biológica, esto podrá ser comprobado llevando a cabo experimentos de mineralización *in silico* en el sistema de contradifusión de gel de silicato. De llevarse a cabo, se podría determinar que la secuencia de pCEMP1 es una región dependiente de los aminoácidos que la componen para llevar a cabo su función biológica mineralizante.

Debido a que en este trabajo se propone que la acción biológica está relacionada a un acoplamiento de pCEMP1 con Hidroxiapatita, se realizará un análisis metabólico de suero extraído mediante RMN de ratas de la cepa Wistar ovariectomizadas, las cuales emulan una condición de osteoporosis y compararlo con grupos de animales sanos y con la condición quirúrgica osteoporótica con el uso de pCEMP1 como terapia para conocer la respuesta general del animal ante el tratamiento, con la finalidad de determinar si pCEMP1 tiene o no otras vías de activación celular.

Elaborar simulaciones de dinámica molecular con el modelo de pCEMP1 y superficies de hidroxiapatita en soluciones saturadas de calcio y fosfato para conocer cuál sería la posible interacción de este péptido en un sistema biológico mineralizante. Esto con la finalidad de seguir aportando información relevante sobre las interacciones del péptido en sistemas biológicos simulados.

REFERENCIAS

- Abdur, A., Zamanb, M. (2017). "Conformational behavior of alpha-2-macroglobulin: Aggregation and inhibition induced by TFE". *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, pp. 539–546
- Álvarez, M., Narayanan S, Zeichner, M., Arzate, H. (2006). "Molecular cloning, expresion and inmunolocalization of a novel human cementum derived Protein (CP23)". *Bone*, 38, pp. 409-419.
- Andre, I., Bradley, P., Wang, C., & Baker, D. (2007). *Prediction of the structure of symmetrical protein assemblies. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(45), 17656–17661.
- Arzate H, Chimal, J., Hernández, L., Díaz de León, L. (1996). "Human cementum Protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in messenquymal cells". *J Periodontol Re*, 31, pp. 144-148.
- Arzate, H., Jiménez, L., Alvarez, M., Landa, A., Bar, I., Pitaru, S. (2002) "Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein". *J Dent Res*, 81(8), pp. 541-6.
- Arzate, H., Olson, S., Page, R., Gown, A., Narayanan, A. (1992). "Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum". *FASEB J*, 6(11), pp. 2990-2995.
- Arzate, H., Olson, S., Page, R., Narayanan, S. (1992). "Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture". *Bone and mineral Res*, 18, pp. 15-30.
- Arzate, H., Zeichner, M., Mercado, G. (2015). "Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontum formation and regeneration". *Periodontology 2000*, 67, pp. 211-233.
- Atala, A., y Lanza, R. (2011). "Principles of Regenerative Medicine". *Academic Press*, 40, pp 733-745.
- Baab, D., Page, R., Morton, T. (1985). "Studies of a family manifesting premature exfoliation of deciduous teeth". *J Periodontol*. 56, 403-409.
- Bartold, P., y Narayanan, A. (1998). "Biology of the periodontal connective tissues". USA: Quintessence Publishing Co, Inc.
- Behrendt, R., White, P., Offer, J. (2016). "Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis". *J. Pept. Sci*, 22 (1), pp 4–27.

- Bloch, F. (1946). "Nuclear induction"., *Physical Review (Physics)*, 70:460-473.
- Bohm. (1992). "Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks". *Protein Engineering*, 5(3), pp. 191-195.
- Bonucci, E. (1992). "Calcification in biological systems". *CRC press*
- Bornhorst, J. (2000). "Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags". *Methods in Enzymology*, 326, 245–254.
- Buck, M., Radford, S., Dobson, C. (1993). "A Partially Folded State of Hen Egg White Lysozyme in Trifluoroethanol: Structural Characterization and Implications for Protein Folding". *Biochemistry*, 32, pp. 669-678
- Carranza, F., Neuman, M. (2006). "Clinical periodontology". 8th edition. W. B. Saunders Company.
- Case, D. T.E. Cheatham (2005). "The Amber biomolecular simulation programs", *J. Computat. Chem*, 26, pp. 1668-1688
- Cavanagh, J. (2006). "Protein NMR Spectroscopy". *Academic Press*, 2nd Edition.
- Cho, M., Garant, P. (2000). "Development and general structure of periodontum". *Periodontology 2000*, 24, pp. 9-27.
- Correa Prado, R. (2016) *Nucleación y/o inhibición del proceso de mineralización in vitro a partir de péptidos derivados de proteínas del cemento*. Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Christensen B, Schytte GN, Scavenius C, Enghild JJ, McKee MD, Sørensen ES. (2020). "FAM20C-Mediated Phosphorylation of MEPE and Its Acidic Serine- and Aspartate-Rich Motif" *JBMR Plus*. 4(8): e10378. doi:10.1002/jbm4.10378
- Cuevas, C. (2011). "Las proteínas desordenadas y su función: una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés". *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 14(2), pp. 97-105.
- Dyson, H., Wright, P. (2005). "Intrinsically unstructured proteins and their functions". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 6 (3), pp. 197-208.
- Fan, D. Lijima, M. Bromley, K. Yang, X. Mathew, S. Moradian-Oldak, J. (2011) "The Cooperation of Enamelin and Amelogenin in Controlling Octacalcium Phosphate Crystal Morphology". *Cells Tissues Organs*, 194, pp. 194-198.
- Fosgerau, K., Hoffmann, T. (2015) "Peptide therapeutics: current status and future directions". *Drug Discov*. 20, pp, 122.
- Garant, P. (2003). "Oral Cells and Tissues". EUA: Quintessence Books

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005). "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server". pp. 571-607
- Greenfield, N. (2006). "Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure". *Nature protocols*, 1(6), pp. 2876-2890.
- Grøftehaug, M. K., Hajizadeh, N. R., Swann, M. J. y Pohl, E. (2015). "Protein–ligand interactions investigated by thermal shift assays (TSA) and dual polarization interferometry (DPI)". *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71(1), pp. 36–44.
- Güntert, P., Mumenthaler, C. & Wüthrich, K. (1997). "Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA". *Journal of Molecular Biology*, 273, pp. 283-298
- He, G., Dahl, T., Veis, A. (2003). "Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1". *Nature materials*. 2, pp. 552-558.
- Hennesey y Johnson (1981). "Information Content in the Circular Dichroism of Proteins". *Biochemistry*, 20 (5), pp. 1085-1094.
- Hernández, F., Marichi, F., Álvarez, M. (2011). "Determinación de sialoproteína ósea en ligamento periodontal al inducir fuerzas ortodónticas". *Revista Odontológica mexicana*, 15(1), pp. 21-26.
- Hoz, L., Romo, E., Zeichner-David, M., Sanz, M., Nuñez, J., Gaitán, L., Arzate, H. (2011). "Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions", *Cell Biology International*, 36(2), pp. 129–136.
- Huynh, K. y Partch, C. (2015). "Current Protocols in Protein Science: Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay". *Current Protocols in Protein Science*, 28(9) pp. 1–28.
- Ivanovski, S., Komaki, M., Bartold, P., Narayanan, A. (1999). "Periodontal-derived cells attach to cementum attachment protein via $\alpha 5\beta 1$ integrin". *J Period Res*, 34, pp. 154-159.
- Jingfeng, Li., Zhenyu, Lin., Qixin, Zheng. (2010). "Repair of rabbit radial bone defects using true bone ceramics combined with BMP-2-related peptide and type I collagen", *Materials Science and Engineering: C*, 30(8), pp. 1272-1279.

- Kagayama, M., Sasano, Y., Zhu, J., Hirata, M., Mizohuchi, I., Kamakura, S. (1998). "Epithelial rest colocalize with cementoblast forming acellular cementum but not with cementoblast forming celular cementum". *Acta Anat*, 163, pp. 1-9.
- Kazumasa, S. Motohisha, O. (2001). "Salt-dependent monomer–dimer equilibrium of bovine-lactoglobulin at pH 3". *Protein Science*, 10, pp. 2325–2335.
- Kelly, S. (2005). "How to study proteins by circular dichroism". *Biochim Biophys Acta*, 1751(2), pp. 119-39.
- Koutsopoulos, S., & Dalas, E. (2000). *Hydroxyapatite crystallization in the presence of serine, tyrosine and hydroxyproline amino acids with polar side groups*. *Journal of Crystal Growth*, 216(1-4), 443–449. doi:10.1016/s0022-0248(00)00415-2
- Kyte, J., Doolittle, R. (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein", *J Mol Biol*, 157(1), pp. 105-132.
- Lara Alvaro. (2011). "Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*". *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2). pp 209-223.
- Lehninger, A. (2009). "Principios de Bioquímica: Lehninger". 5° edición. España: OMEGA.
- Lian, B., Stein, G., Stein, J., van Winjen, A. (1998). "Osteocalcin gene promoter: Unloking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation". *J Cell Bio Supplements*, 30, pp. 62-72.
- Lijima, M. (2002). "Elongated Growth of octacalcium phosphate crystals in recombinant amelogenin gels under controlled ionic Flow". *SAGE Journals*,81(1), pp. 69-73.
- Lindhe, J. (2003). "Periodontología clínica e implantología odontológica". España, Médica Panamericana.
- McCulloch, C., Lekic, P., McKee, M. (2000). "Role of physical forces regulating the form and function of the periodontal ligament". *Periodontology 2000*, 24, pp. 56-72.
- MacPhee, C. E., Perugini, M. A., H. Sawyer, W., & Howlett, G. J. (1997). *Trifluoroethanol induces the self-association of specific amphipathic peptides*. *FEBS Letters*, 416(3), 265–268. doi:10.1016/s0014-5793(97)01224-6
- Montoya, G., Arenas, J., Romo, E., Zeichner, M., Alvarez, M., Narayanan, A., Velázquez, U., Mercado, G., Arzate, H. (2014). "Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo". *Bone*, pp. 154–164.

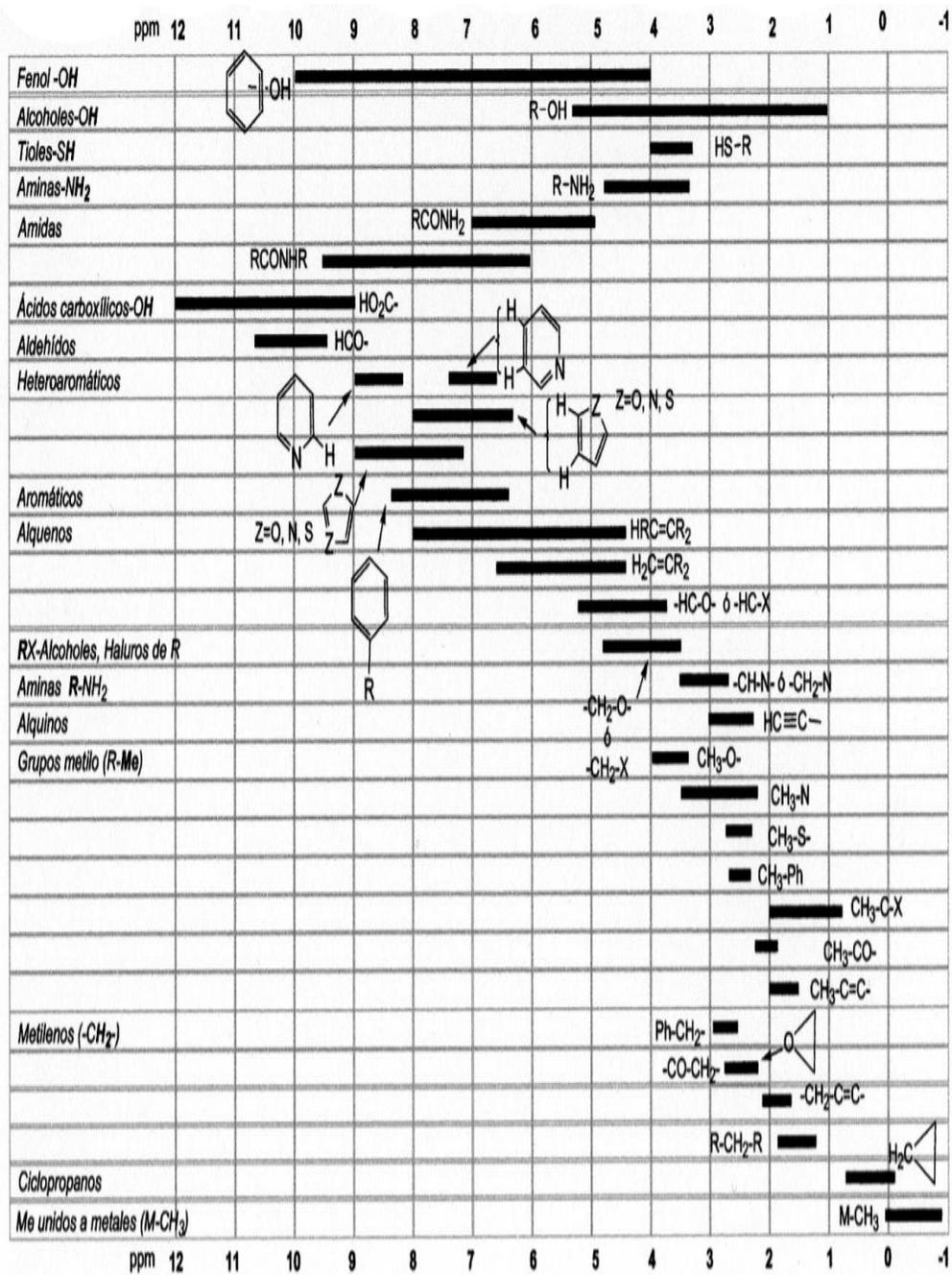
- Nakae, H., Narayanan, A., Raines, E., Page, R. (1991). "Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum". *Biochemistry*, 20, pp. 7047-7052.
- Nanci, A., Bosshardt, D. (2006). "Structure of periodontal tissue in health and disease". *Periodontology 2000*, 40, pp. 11-28.
- Nanci, A. (2007). "Ten Cate's oral histology: Development, structure, and function". E.U.A, Mosby.
- Nicholas, J. Fraser, J. (2016). "Evolution of Protein quaternary structure in response to selective pressure for increased thermostability", *Journal of Molecular Biology*, 428(11), pp. 2359-2371.
- Nidome Campos, M. (2018) *Estudio de plegamiento y estabilidad estructural de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP)*. Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Page, R., Engel, D., Narayanan, A., Clagett, J. (1978). "Chronic inflammatory gingival and periodontal disease". *JAMA*, 240, pp. 545-550.
- Palazzo, B., Walsh, D., Iafisco, M., Foresti, E., Bertinetti, L., Martra, G., ... Roveri, N. (2009). *Amino acid synergetic effect on structure, morphology and surface properties of biomimetic apatite nanocrystals*. *Acta Biomaterialia*, 5(4), 1241–1252. doi:10.1016/j.actbio.2008.10.024
- Patiño, E. (2014). "Cristalización y predicción de la estructura tridimensional de la proteína homóloga del receptor activado para la quinasa c (lack) de leishmania". *Química orgánica y bioquímica*, 43(3), pp. 17-23.
- PDF#860740
- Pitaru, S., McCulloch, C., Narayanan, S. (1994). "Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing". *J Periodontal Res*, 29, pp. 81-94.
- Pitaru, S., Narayanan, S., Olson, S., Savion, N., Hekmati, H., Alt, I., Metzger, Z. (1995). "Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces". *J Periodont Res*, 30, pp. 360-368.
- Povey, F. (2006). "Comparison of the effects of 2,2,2-trifluoroethanol on peptide and protein structure and function". *Journal of Structural Biology*, 157, pp. 329–338

- Purcell, E, Torrey, H, Pound, R. (1946). "Resonance adsorption by nuclear magnetic moments in a solid", *Physical Review (Physics)*. 69:37-38.
- Rautaray, D., Mandal, S., & Sastry, M. (2005). *Synthesis of Hydroxyapatite Crystals Using Amino Acid-Capped Gold Nanoparticles as a Scaffold*. *Langmuir*, 21(11), 5185–5191. doi:10.1021/la048541f
- Ramachandran, G., Ramakrishnan, C., Sasisekharan, V. (1963). "Stereochemistry of polypeptide chain configurations". *J. Mol. Biol.* 7: 95-9.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. (2009). "Detergent binding anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins". *PNAS*, 106 (6), pp. 1760-1765.
- Rhodes, G. "Crystallography Made. Crystal Clear: A guide for users of macromolecular models". Second edition. USA. Elsevier Science.
- Riggs, D. (1980) "Synthesis, cloning, and expression of hormone genes in *Escherichia coli*", *Recent Progress in Hormone Research*, 36, pp. 261-276.
- Roach, H. (1994). "Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption". *Cell Biol Int*, 18, 617-628.
- Romo, E., Arzate, H., Montoya, G., Rodriguez, Adela. (2016). "High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum Protein 1 with lectin activity". *FEBS Lett.*, 590(1), pp. 129-138.
- Saito, M., Iwase, M., Maslan, S., Nozaki, N., Yamauchi, M., Handa, K., Takahashi, O., Sato, S., Kawase, T., Teranaka, T., Narayanan, A. (2001). "Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis". *Bone*, 29(3), pp. 242-8.
- Salgado Chavarría, F. (2017) *Desarrollo de la fase preclínica de fármacos peptídicos derivados de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) y su potencial eficacia en el tratamiento de la osteoporosis*. Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México
- Saygin, N., Giannobile, W., Somerman, M. (2000). "Molecular and cell biology of cementum". *Periodontology 2000*, 24, pp. 73-98.
- Schroeder, H., Listgarten, M. (1997). "The gingival tissues: the architecture of periodontal protection". *Periodontology 2000*, 13, pp. 91-120.

- Sharma, V., Srinivasan, A., Nikolajeff, F., & Kumar, S. (2020). "Biom mineralization Process in Hard Tissues: The Interaction Complexity within Protein and Inorganic Counterparts", *Acta Biomaterialia*.
- Silverman, L. (2004). "Diffusion systems for evaluation of biom mineralization". *Calc Tiss Int*, 75, pp. 494-501.
- Singh, R. (1995). "Reagents for rapid reduction of Disulfide bonds in proteins" *Academic Press*.
- Sreerama, N., Venyaminov, S., Woody, R. (1999). "Estimation of number of a helical and b strand segments in proteins using CD spectra". *Protein Science*, 8(2), pp. 370-380.
- Streeter, V., Wyle, E., Bedford, K. (2000). "Mecánica de los fluidos". México: McGraw-Hill Interamericana.
- Suzuki, S., Haruyama, N., Nishimura, F., & Kulkarni, A. B. (2012). "Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues". *Archives of Oral Biology*, 57(9), 1165–1175. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.03
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.
- Tiselius, A. (1956). "Protein chromatography on calcium phosphate columns". *Arch Biochem Biophys*, 65, pp. 132-155.
- Tobeiba, M., Moghadasian, N. (2020). "RANKL/RANK/OPG Pathway: A mechanism involved in exercise-induced bone remodeling", *Biomed Research International*.
- Tavafoghi, M., & Cerruti, M. (2016). *The role of amino acids in hydroxyapatite mineralization*. *Journal of The Royal Society Interface*, 13(123), 20160462. doi:10.1098/rsif.2016.0462
- Valdés De Hoyos, A., Hoz-Rodríguez, L., Arzate, H., Narayanan, A. (2012). "Isolation of Protein-Tyrosine Phosphatase-like Member-a Variant from Cementum". *Journal of Dental Research*, 91(2), 203–209.
- Venyaminov, S. y Yang, J. (1996). "Determination of protein secondary structure In Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules". EUA.: Fasman, pp. 69–107.

- Villarreal, E., Moreno, A., Mas, J., Chávez, J., Narayanan, A., Gil, I., Arzate, H. (2009) "Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biomineralization". *BBRC*, 384, pp. 49-54.
- Whyte, M., Peck, W. (1989). "Alkaline phosphatase: physiological role explored in hypophosphatais". *Bone and mineral research*, 6 pp. 175-218.
- Wu, D., Ikezawa K., Parker, T., Saito, M., Narayanan, A. (1996). "Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein". *J Bone Miner Res*, 11(5), pp. 686-692.
- Zhang. (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction". *BMC Bioinformatics*, 9, pp. 40.
- Zimmer, C., Birch-Hirschfeld, E., y Weiss, R. (1974). "CD studies on the conformation of some deoxyoligonucleotides containing adenine and thymine residues", *Nucleic Acids Research*, 1(8), pp. 1017–1030.

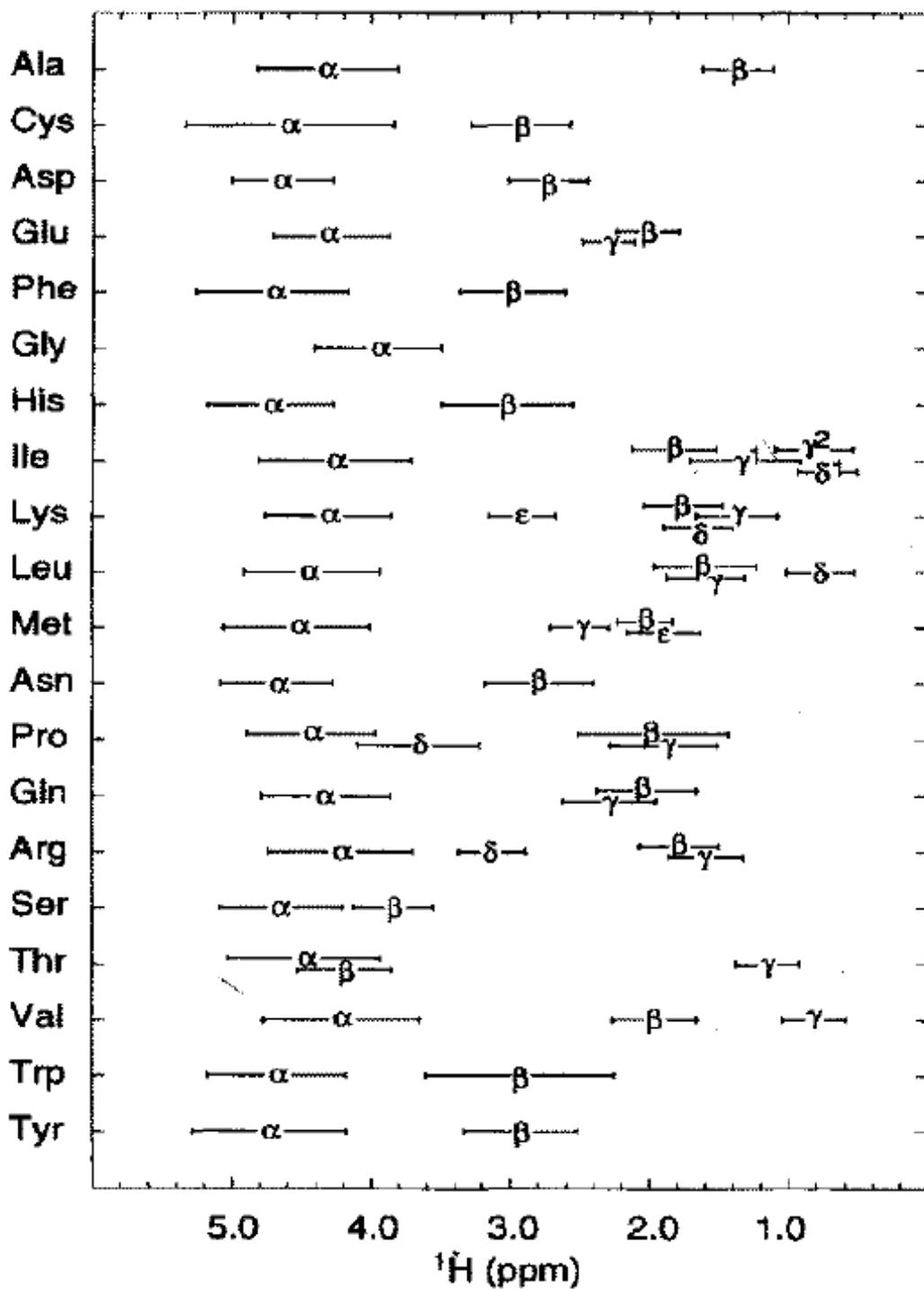
APÉNDICE 1



Desplazamientos químicos en RMN 1H de diferentes tipos de compuestos orgánicos

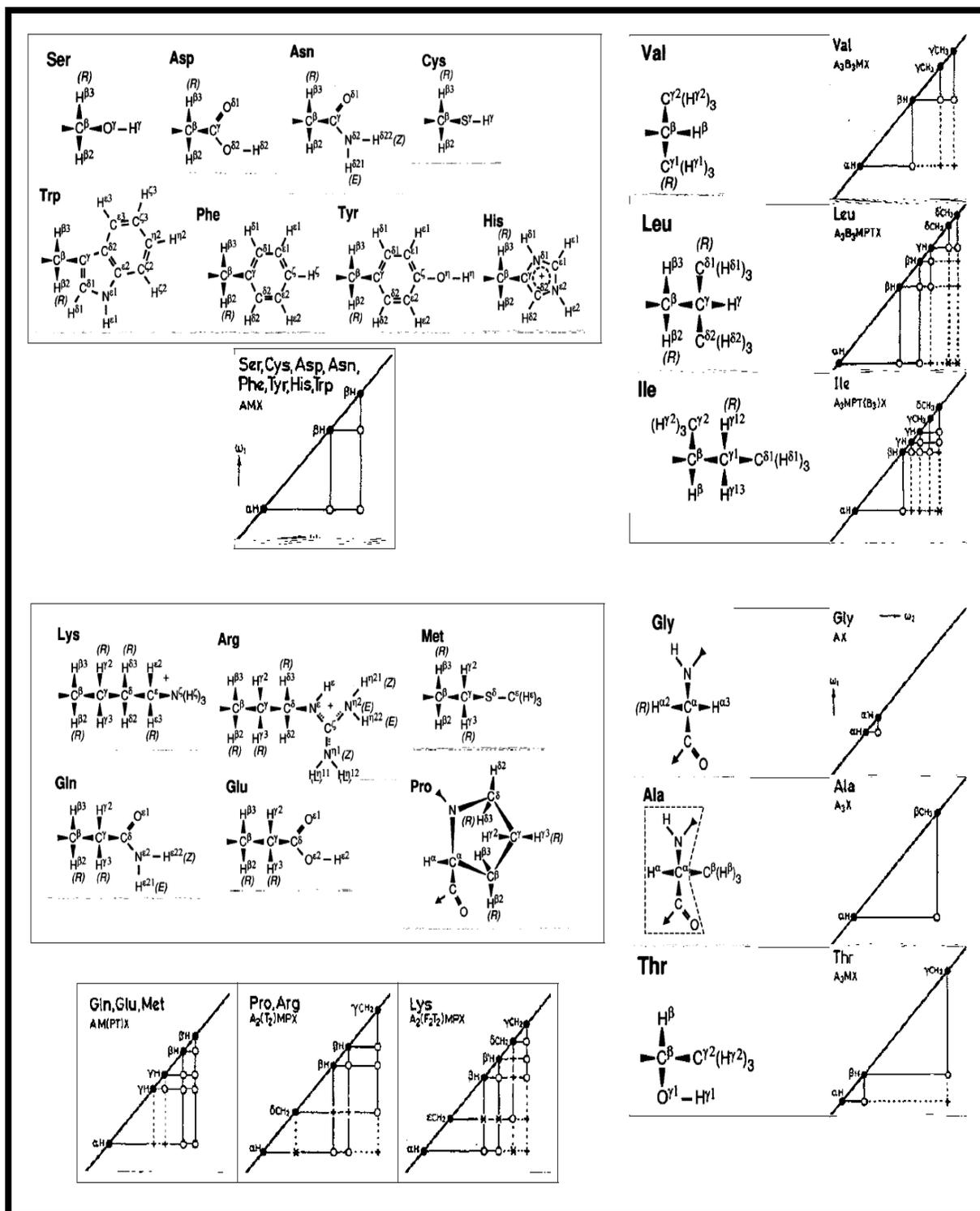
<https://www.bruker.com>

APÉNDICE 2



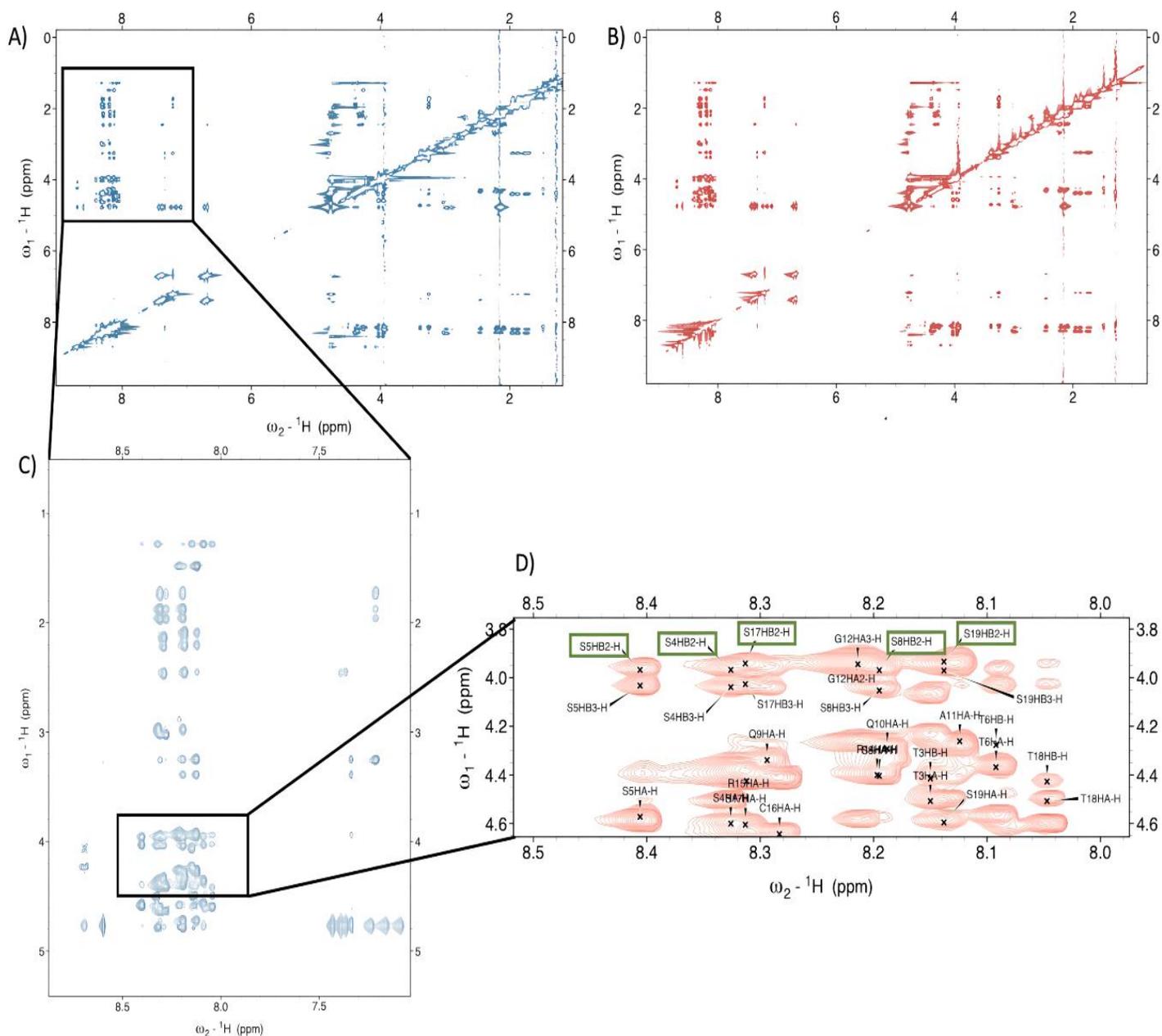
Desplazamiento químico de protones alifáticos de ^1H . Cavanagh et al.

APÉNDICE 3



Sistemas de Spin de aminoácidos (Cavanagh, 2006)

APÉNDICE 4



Espectros de Resonancia Magnética Nuclear del péptido de CEMP1 obtenidos a 700 MHz. A) NOESY a 150 ms. B) NOESY a 300 ms. C) Región NH de NOESY a 150 ms. D) Se muestra en cuadros verdes la asignación de serinas en NOESY a 150 ms.