



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**



**INHIBICIÓN DEL PROCESO DE MINERALIZACIÓN POR MEDIO DE
INTERFERENCIA DEL ARNm DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN
DEL CEMENTO (CAP)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

P R E S E N T A

MERCEDES BERMÚDEZ CORTÉS

TUTOR

DR. HIGINIO ARZATE



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
A. PERIODONTO.....	5
B. CEMENTO RADICULAR.....	5
a) cementogénesis.....	7
b) biomineralización del cemento.....	8
c) la proteína de adhesión del cemento (cap).....	12
C. REGENERACIÓN PERIODONTAL.....	14
D. ARN DE INTERFERENCIA.....	20
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
5. HIPÓTESIS.....	23
6. OBJETIVO GENERAL.....	23
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
8. METODOLOGÍA.....	24
A. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN DEL SIRNA PARA CAP Y TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS	24
B. CULTIVO CELULAR.....	30
C. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE FOSFATASA ALCALINA (ALP).....	31
D. ENSAYO DE MINERALIZACIÓN.....	31
E. EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL.....	32
F. EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL TRADUCCIONAL.....	32
G. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33

9. RESULTADOS.....	34
10. DISCUSIÓN.....	42
11. CONCLUSIONES.....	50
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. RESUMEN

El cemento contiene moléculas específicas que podrían servir para identificar, aislar y caracterizar el linaje cementoblástico y para determinar los mecanismos celulares y moleculares que regulan la cementogénesis; proceso clave en la regeneración de tejidos periodontales. Una de esas moléculas es la proteína de adhesión del cemento (CAP); caracterizada como un splicing alternativo del gen que codifica para PTPLA (proteína parecida a la tirosina fosfatasa que contiene prolina en lugar de arginina catalítica, miembro A). CAP es expresada por cementoblastos y células progenitoras localizadas paravascularmente en el ligamento periodontal y participa en el proceso de mineralización *in vitro* de cementoblastos putativos humanos; adicionalmente, presenta una alta afinidad a la hidroxiapatita.

Hipótesis.

El silenciamiento del ARN del gen que codifica para CAP disminuirá la expresión a nivel transcripcional y traduccional de moléculas asociadas al proceso de mineralización, particularmente aquellas asociadas al proceso de la cementogénesis.

Objetivo.

Determinar el papel regulador de CAP durante el proceso de la cementogénesis *in vitro*.

Metodología.

Para el silenciamiento del gen que codifica para CAP, se utilizaron cementoblastos humanos putativos, los cuales fueron transfectados con el ARN de interferencia que reconoce el mensajero de CAP con la finalidad de inhibir su expresión. El efecto del silenciamiento se analizó al evaluar a nivel transcripcional la expresión de CAP y a nivel traduccional la expresión de moléculas

asociadas al proceso de cementogénesis (ALP, BSP, CEMP1, OPN) por medio de ensayos enzimáticos, RT-PCR, inmunotransferencias y por la formación de nódulos de mineral teñidos con alizarina roja.

Resultados.

Nuestros resultados muestran que se logró la disminución a nivel transcripcional de CAP y que las moléculas asociadas al proceso de la cementogénesis (BSP, CEMP1 OPN), incluida CAP disminuyeron a nivel traduccional. También fue evidente la disminución en la actividad enzimática de la ALP. Lo anterior dio como resultado la inhibición del depósito de mineral cuando se llevó a cabo el silenciamiento de CAP.

Conclusiones.

Nuestros resultados indican que CAP es una molécula o factor clave en la regulación del proceso de mineralización, por lo que constituye una alternativa terapéutica novel para lograr la regeneración de las estructuras periodontales que han sido perdidas debido a la periodontitis.

2. ABSTRACT

Cementum is a mineralized tissue that contains several molecular markers that could serve to identify, isolate and characterize the cementoblastic lineage and to determine the cellular and molecular mechanisms which are involved in the regulation of the cementogenesis process in order to achieve periodontal tissue regeneration. One of these molecular markers is the cementum attachment protein (CAP); characterized as a PTPLA-like protein. This protein has shown to promote attachment, spreading and differentiation of mesenchymal and periodontal ligament cell populations.

Hypothesis.

Down-regulation of CAP, using a gene silencing (siRNA) strategy, affects the transcriptional and translational level expression levels of molecules associated with the cementogenesis process.

Objective.

The aim of this project was to explore the role that CAP plays in regulating the cementogenesis process *in vitro*.

Methods.

For gene silencing of CAP, we transfected CEMP cells with a vector containing the interference RNA sequence of CAP. After transfection of CEMP cells, we evaluated the down-regulation of CAP by RT-PCR and measured: alkaline phosphatase activity, nodule formation by alizarin red S staining and the expression of bone-related molecules (CAP, BSP, CEMP1, OPN) by western blot.

Results.

Our results showed that down-regulation of mRNA of CAP decreased alkaline phosphatase activity, reduced levels of expression of bone-related molecules associated with the cementogenesis process and affected mineral deposition by CEMP cells.

Conclusion.

Our findings by using a gene silencing strategy, indicated that CAP is an important key molecule that regulates the cementogenesis process at the cellular and molecular level of this lineage *in vitro*, affecting the mineralization process.

3. INTRODUCCIÓN.

A. PERIODONTO.

Es una unidad compleja que tiene como función principal dar soporte a los órganos dentarios. Está formado por encía, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular (figura 1). En conjunto, estos tejidos proveen el anclaje de los órganos dentarios al alveolo, distribuyen las fuerzas de masticación y constituyen un reservorio de células para la homeostasis, regeneración y reparación del tejido (Lindhe, 2003; Cho y Garant, 2000).

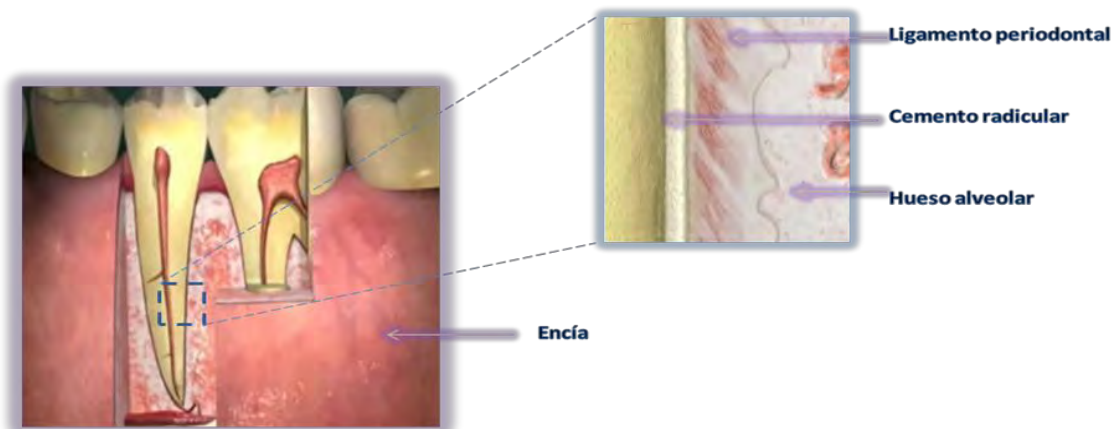


Figura 1. El periodonto.

El cemento radicular cobra importancia debido a que en él se insertan las fibras del ligamento periodontal y porque se ha demostrado que la formación del cemento es un requisito para el desarrollo y la regeneración de estructuras periodontales (Berry et al, 2003).

B. CEMENTO RADICULAR.

Es un tejido conectivo especializado, mineralizado, que no presenta vascularización ni inervación y cubre la superficie de la raíz de los órganos dentarios. No presenta procesos de remodelación

pero si un proceso de aposición constante. Además de mediar la inserción de las fibras del ligamento periodontal se encarga también de distribuir las fuerzas de la masticación y es parte sustancial para que se dé la reparación de la superficie radicular. Estas funciones son afectadas por procesos inflamatorios e infecciosos como la periodontitis, la cual es considerada un problema de salud a nivel mundial. A pesar de la importancia que cobra, es un tejido pobremente definido a nivel celular y molecular, debido en parte, a su distribución tan limitada (Lindhe, 2003; Bartold Narayanan, 2006).

En 1993 Schoroeder presentó una clasificación del cemento, basándose en la ausencia o presencia de células y la organización de las fibras colágenas como se presenta a continuación:

- Cemento acelular, afibrilar: se localiza en la unión dentina-esmalte, consiste de una matriz homogénea sin componentes celulares ni fibras colágenas.
- Cemento celular con fibras intrínsecas: cubre la parte apical e interradicular de las superficies radiculares, donde hay presencia de cementocitos y fibras colágenas intrínsecas. Se cree que está involucrado en la reparación ya que se encuentra dispuesto también en zonas de trauma.
- Cemento acelular con fibras intrínsecas: se sitúa en zonas apicales e interradiculares pero no contiene células.

Su constitución puede dividirse en un 50% de matriz inorgánica conformada por fosfatos de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ aunque también se encuentran trazas de magnesio, flúor, sodio, cobre, azufre y zinc (Schoeder, 1993). El otro 50% es matriz orgánica, la cual está compuesta predominantemente por colágena tipo I y III, además de otras proteínas colágenas entre las que se encuentran las tipo V, VI y XII. También se conforma por proteínas no colágenas que participan en el proceso de mineralización, durante la formación de la raíz, como son la sialoproteína ósea (BSP), proteína de la matriz dentinaria-1 (DMP-1), sialoproteína

dentinaria, fibronectina, osteonectina, osteocalcina, osteopontina, tenansina, proteoglicanos, proteolípidos y factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado del cemento (CGF) (Saygin et al, 2000; Garant, 2003; Bartold y Narayanan, 2006; Alvarez-Perez et al, 2006; Zeichner-David et al, 2006). También se encuentran contenidas proteínas específicas como son la proteína del cemento 1 (CEMP1) (Arzate, *et al*, 2002) y la proteína de adhesión del cemento (CAP), (Saito, 2001; Arzate et al, 1992).

a) Cementogénesis.

Se conoce que durante el desarrollo de la raíz, cuando se ha depositado la primera capa de dentina radicular, las células de la vaina epitelial radicular de Hertwig (HERS) pierden continuidad y forman los restos epiteliales de Malassez que, en la vida adulta, permanecen cerca de la superficie radicular. Cuando la continuidad se ha perdido, las células foliculares ectomesenquimales empiezan a depositar el cemento sobre la dentina recién depositada y/o sobre la matriz secretada por las células de HERS. La región apical de la raíz en desarrollo contiene células ectomesenquimales progenitoras de fibroblastos, preodontoblastos y precementoblastos (Carlson, 1990; Garant, 2003; Zeichner-David et al, 2006).

En los últimos años se ha postulado que las células de HERS producen una membrana basal con proteínas quimiotácticas que dirigen la migración de células precementoblásticas e inducen la diferenciación a cementoblastos. Las moléculas presentes son proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, proteínas del esmalte y moléculas de adhesión como la CAP. Cuando el órgano dentario ocluye con su antagonista, la proliferación de células de HERS disminuye y algunas células se quedan atrapadas en la matriz mineralizada por lo que se cree que éstas pueden sufrir una transformación ectomesenquimal y convertirse en cementoblastos funcionales. Se cree que los cementoblastos pueden además, derivarse del folículo dental (Cho y Garant, 2000; Zeichner_David, 2006). Asimismo, las células progenitoras del ligamento periodontal,

osteoblastos y cementoblastos, adoptan una localización paravascular en el ligamento periodontal y estas células muestran algunas características de células troncales y pueden generar tejido funcional (Arzate *et al*, 1996; Pitaru *et al* , 1994; Mc Culloch *et al*, 2000; Bosshardt, 2005; Zeichner_David, 2006).

b) Biomineralización del cemento radicular

Las fibras de colágena sirven de andamio para que se dé el proceso de mineralización con ayuda de las proteínas no colágenas, por lo que la nucleación que ocurre en el cemento radicular es heterogénea (figura 2). Para que el proceso de biomineralización se lleve a cabo es necesario que las células participantes interactúen con su sustrato mediante integrinas, lo que favorece la organización del citoesqueleto y activa procesos como la proliferación y diferenciación, también se propicia la expresión de moléculas como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF β), el factor de crecimiento tipo insulínico (IGF-I), proteínas morfogénicas del hueso (BMP`s) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). La interacción a través de las integrinas propicia que se expresen otras proteínas que favorecen la formación de matriz extracelular, así como el desarrollo del sistema de inserción del periodonto. Durante el proceso de proliferación, las células secretan proteínas que forman parte de la matriz extracelular como la colágena tipo I, la fibronectina y la trombospondina que participan en el proceso de adhesión celular. La decorina y el biglicano (roteoglicanos) proveen un ambiente favorable para que se desarrolle la mineralización de la matriz extracelular (Sena *et al* , 2003; Matias *et al*, 2003).

La disminución en la proliferación celular y por tanto en la expresión de colágena se da a la par con un incremento en la expresión y actividad de la fosfatasa alcalina, que al parecer regula la concentración de fosfatos disponibles para que se lleve a cabo el proceso de biomineralización. Además, existe también la participación de otras proteínas no-colágenas tales como BSP, OPN y

OCN. Estas proteínas participan activamente en el proceso, ya sea promoviendo la nucleación de los cristales de hidroxiapatita o modulando su crecimiento (tabla 1).



Figura 2. El proceso de biomíneralización es dado por la interacción de diversas proteínas que modulan la formación de cristales de hidroxiapatita.

Tabla 1. Función de las proteínas no colágenas en la biomineralización.

<p>Nucleación</p>	<p>Sialoproteína ósea (BSP): es una glicoproteína de 45-70KDa; contiene un motivo RGD (arginina-glicina-acido aspártico) por lo que se asocia con la adhesión celular por medio de integrinas y se cree que contribuye al inicio de la formación de tejido mineralizado (Bartold y Narayanan, 1998; Viswanathan et al, 2003; Nanci y Bosshardt, 2006).</p>
<p>Modulación</p>	<p>Osteocalcina (OCN): tiene una masa de 5.8-6KDa; presenta 2 o 3 residuos de ácido glutámico que son modificados por carboxilación (residuos gla) y estos le confieren alta afinidad a minerales como el calcio. Se cree que participa en la maduración de los cristales de hidroxiapatita (Lian <i>et al</i>; 1998; Nanci y Bosshardt, 2006).</p> <p>Osteopontina (OPN): es una fosfoproteína glicosilada de 41.5KDa con un alto contenido de ácido aspártico, contiene sitios putativos de unión al calcio, posee dominios RGD de adhesión celular, se une a colágena, fibronectina y osteocalcina. Al parecer modula e inhibe el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita y también promueve la adhesión de células progenitoras del ligamento periodontal durante la formación del cemento radicular (Mac Neil et al, 1995; Nanci y Bosshardt, 2006).</p> <p>Fosfatasa alcalina (ALP): es una proteína glicosilada con actividad de enzima, se encuentra en las vesículas de matriz que contribuyen a la mineralización de la matriz extracelular formando fosfatos de calcio amorfos y</p>

cristales de hidroxiapatita. Se cree que es responsable de regular las concentraciones extracelulares de fosfatos, desfosforilando diversas moléculas. Es un indicador temprano de biomineralización (Sela, 1992; Van den Boss et al, 2005; Nanci y Bosshardt, 2006).

Proteína del cemento 1 (CEMP1): es una proteína de aproximadamente 50KDa; se localiza y expresa sólo en poblaciones del ligamento periodontal con una posición paravascular, cementoblastos y células de espacios endosteales, por lo que podría constituir un marcador para cementoblastos. Se cree que está involucrada en la regulación de la morfología, depósito y composición de los cristales de hidroxiapatita, así como en la regulación de la expresión de ALP, OPN y BSP en cementoblastos putativos *in vitro*, por lo que es probable que juegue un papel importante en la diferenciación de los cementoblastos y la mineralización de la matriz extracelular (Arzate *et al*, 2002; Álvarez-Pérez *et al*, 2006).

c) La proteína de adhesión del cemento (CAP)

Es una proteína de 54-57 KDa que se ha aislado, caracterizado y purificado a partir de extractos de cemento maduro, bovino y humano. A pesar de que presenta homología con la colágena tipo I y XII, no se ha encontrado relación inmunológica (Arzate, *et al* 1992; Saito *et al*, 2001; Wu *et al*, 1996). Se ha logrado inmunolocalizarla en la matriz del cemento radicular, en células paravasculares del ligamento periodontal, en espacios endosteales del hueso alveolar, donde se cree que podrían estar las células progenitoras del ligamento periodontal y en cementoblastos putativos *in vitro* e *in vivo* (Arzate *et al*, 1998; Bar-kana *et al*, 2000).

Se ha mostrado que CAP promueve diversas actividades biológicas tales como la migración a la superficie radicular con mayor afinidad para células del ligamento periodontal y del hueso alveolar que para fibroblastos gingivales (Olson *et al*, 1991; Pitaru *et al*, 1995; Metzger *et al*, 1998). Afecta la diferenciación de células progenitoras de cementoblastos en el ligamento periodontal *in vitro* (Saito *et al*, 2001). Es probable que por presentar un motivo RGD en su secuencia tenga alta afinidad por la fibronectina, hidroxiapatita, dentina y cemento radicular (Mc Allister, 1990; Arzate *et al*, 1992; Pitaru *et al*, 1993). Se sabe que CAP promueve la adhesión celular mediada a través de integrinas $\alpha 5\beta 1$ (Ivanovski *et al*, 1999) y promueve una mayor adhesión de fibroblastos gingivales humanos *in vitro* en comparación con la colágena tipo I (Arzate *et al*, 1992). Se ha demostrado que CAP incrementa la actividad de la ALP y que promueve la mineralización en células mesenquimatosas ya que induce la diferenciación celular (Arzate *et al*, 1996). Además, se ha utilizado como marcador de células progenitoras de los cementoblastos en el ligamento periodontal adulto humano (Liu *et al*, 1997; Bar-kana *et al*, 1998).

Se sabe también que CAP estimula la actividad de la MAPK, induciendo la expresión de Fos en fibroblastos gingivales humanos aunque no se sabe aun cual es su receptor (Saito *et al*, 1999).

Sin embargo, recientemente y utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CAP bovina (3G9), se realizó el tamizaje de una biblioteca de expresión λ , construida a partir de ARNm obtenido de células cementoblásticas humanas putativas. El 75 % de las clonas aisladas representó un cDNA que codifica para PTPLA o su sinónimo que es la proteína de adhesión del cemento radicular. La producción de la proteína recombinante humana indica que posee una alta afinidad por la hidroxiapatita y promueve la adhesión celular, incrementa la actividad específica de fosfatasa alcalina e induce la expresión de marcadores asociados al proceso de mineralización, particularmente aquellos asociados al proceso de la cementogénesis.

C. REGENERACIÓN PERIODONTAL.

La enfermedad crónica infecciosa que afecta los tejidos que soportan al órgano dentario es conocida como enfermedad periodontal y ésta resulta en la inflamación de las estructuras de soporte y eventualmente en la pérdida de las mismas. Se sabe que la destrucción es, en parte, causada también por la respuesta inflamatoria e inmune del hospedero (AAP, 2001; Newman et al, 2003).

Lo que se busca cuando se intenta revertir el daño causado por el proceso de la enfermedad periodontal, es que se logre una regeneración total anatómica y funcional de las estructuras perdidas para que se recupere la función de los órganos afectados. Es decir, lo que se requiere es la restauración de la altura del hueso alveolar a la unión cemento-esmalte, la regeneración del tejido conectivo gingival destruido por el proceso inflamatorio, la formación de nuevo cemento radicular en las superficies radiculares expuestas, la síntesis de las fibras de Sharpey y su inserción en la superficie radicular, y finalmente, el restablecimiento de sellado epitelial en la porción coronal.

El hecho es que para que ocurra la regeneración se requiere que se desarrollen procesos biológicos tales como la proliferación, migración, adhesión y diferenciación de diversos tipos celulares de manera coordinada en tiempo y espacio, y el mayor problema al que nos enfrentamos es que se conocen muy pocos detalles acerca de la regulación de dichos procesos. A pesar de ello, se han realizado ensayos clínicos que indican que la regeneración periodontal es alcanzable pero aun no se logran resultados óptimos ni predecibles (Ivanovski et al , 2001; Okuda et al, 2003; Zeichner-David, 2006).

Para lograr la regeneración periodontal se han utilizado materiales y biomoléculas con resultados prometedores pero que presentan aún diversos inconvenientes. Los materiales empleados para

este fin son llamados aloplásticos si son sintéticos, autoinjertos si se trata de tejido que se cambia de un sitio a otro en el mismo individuo, aloinjertos si se trata de tejido de otro individuo de la misma especie pero con diferente composición genética y xenoinjertos si se trata de tejido de una especie diferente.

La terapia periodontal que se emplea actualmente, se ocupa de controlar y detener la progresión de la enfermedad periodontal, utilizando medidas que ataquen la infección y que regeneren los tejidos perdidos durante la enfermedad como son el curetaje, el raspado y alisado radicular, la regeneración tisular guiada, los injertos óseos y el uso de factores de crecimiento.

Lo que parece funcionar mejor es la combinación de varias técnicas, en las que se usen células seleccionadas, un biomaterial, moléculas señalizadoras y componentes de la matriz extracelular para permitir que el proceso de proliferación y especialización conduzca a una verdadera regeneración. (Grzesik y Narayanan, 2002; Ivanovski et al, 2006, Bartold et al 2006). Las técnicas más empleadas a la fecha se muestran resumidas en la tabla 2.

Tabla 2. Técnicas empleadas para controlar y detener la progresión de la enfermedad periodontal.

INDUCTOR	DESCRIPCIÓN	RESULTADOS	DESVENTAJAS
Injertos óseos	En defectos óseos, mediante autoinjertos, aloinjertos, hidroxiapatita no porosa o en cementos y hueso anorgánico.	Se logra una disminución en la profundidad de sondeo, y comparado con los resultados del curetaje, muestra un incremento de nivel de hueso y de inserción.	No hay evidencia suficiente que muestre que funcionan en defectos en furcaciones y no todos los pacientes tienen el mismo resultado. (American Academy of Periodontology,2005)
Regeneración tisular guiada	Se colocan membranas con el fin de que se dé una selección de población celular que repoblará el sitio del	Se basa en el fundamento de que en el ligamento periodontal se encuentran las células progenitoras para todos los tejidos periodontales. Estudios	Se ha cuestionado si esta terapia realmente produce la regeneración del cemento ó solo la formación de cementoide ya que el nuevo cemento es celular y presenta menor adhesión a la superficie del

	defecto, excluyendo a las células del tejido conectivo gingival y evitando la formación de un epitelio de unión largo.	experimentales en animales han demostrado la formación de cemento, ligamento periodontal y hueso.	esmalte. Cuando se usa una membrana no absorbible se corre el riesgo de infección y el tratamiento quirúrgico para retirarla. (Karting et al, 1993; Kostopoulos et al, 2004; American Academy of Periodontology,2005)
Factores de crecimiento : factor derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento tipo insulínico, (IGF-I), factor de crecimiento transformante β (TGF-β) y factor de crecimiento fibroblástico (FGF)	Se usan localmente en la superficie radicular para facilitar la cicatrización, permitiendo la formación de tejido conectivo y cemento.	Se ha sugerido que estas moléculas son producidas durante la formación del cemento y permanecen en la matriz del cemento maduro y que tienen el potencial de inducir reparación. Los más utilizados son el PDGF y el IGF-I, que en conjunto han demostrado poder de regeneración en perros y primates .	Algunos factores de crecimiento carecen de actividad específica en ciertos linajes celulares; además, pierden de forma rápida su potencial de acción por lo que se requiere de grandes concentraciones para obtener buenos resultados (Lynch et al, 1991; Rutherford et al, 1993; Giannobile et al, 1994; Cho, 1995; Howell et al, 1997; Beersten et al, 1997; Gao et al, 1998; D`Obarrio, 2000)
Proteínas morfogénicas de hueso (BMPs)	Se han detectado durante el desarrollo periodontal la BMP-3, BMP-7 y se han inmunolocalizado en hueso alveolar, cemento y ligamento periodontal. Miembros de esta familia como son los factores de crecimiento y su diferenciación GDF 5, GDF 6 y GDF7	Recientemente se ha visto que un polipéptido sintético de la BMP-6 en un defecto periodontal de rata incrementa la formación de cemento nuevo. También se ha utilizado la BMP-7 con resultados similares	Se necesitan altas concentraciones de BMPs para obtener buenos resultados ,además carecen de actividad específica en ciertos linajes celulares y pierden de forma rápida su potencial de acción (Lynch et al, 1991; Rutherford et al, 1993; Giannobile et al, 1994; Cho, 1995; Howell et al, 1997; Beersten et al, 1997; Gao e al, 1998; D`Obarrio, 2000;; Zhao et al, 2003; Nakashima et al, 2003)
EMDOGAIN	Es un derivado de proteínas de matriz	Experimentos <i>in vitro</i> han demostrado que las células	En muchos estudios, los resultados obtenidos no son mejores a los

del esmalte de de periodonto son reactivas, obtenidos con otros tratamientos y porcino. Se obtiene a incrementando la proliferación los estudios histológicos revelaron partir de extractos y favoreciendo la adhesión; que es impredecible, dando como crudos de matriz de también tiene efecto en la resultado la formación de cemento dientes en desarrollo. expresión de moléculas celular (Lysaght et al, 1998; Se sabe que su asociadas a la Gestrelius et al, 2000; actividad es mediada biom mineralización, regulando Greenstein,2000; Heard et al, por BMP-2 y BMP-4 positivamente la expresión de 2000; Haase et al, 2001; Sculean, BSP y OCN 2005; Bosshardt et al, 2006; Zeichner-David, 2006; Swanson et al, 2006)

También existen alternativas mediante la ingeniería de tejidos, proponiendo el autoinjerto de células del ligamento periodontal sobre las superficies radiculares tratadas con factores quimiotácticos, autoinjertos de células madre de medula ósea y terapia génica.

El avance en la ingeniería genética y en el estudio de las células progenitoras, ha dado lugar a investigaciones que se enfocan en el estudio de los mecanismos biomoleculares que regulan la formación del periodonto y de los procesos metabólicos que regulan estos mecanismos para que, con este conocimiento, se logre una verdadera regeneración periodontal.

Debemos recordar la importancia del estudio del cemento radicular debido a que en él se insertan las fibras del ligamento periodontal y sabemos que la formación del cemento radicular es un requisito para el desarrollo y la regeneración de estructuras periodontales.

Se ha sugerido que subpoblaciones celulares del ligamento periodontal podrían contener el linaje cementoblástico, el cual se originaría en zonas paravasculares del ligamento periodontal, pero no se conocen los factores que inducen la proliferación de los precursores, tampoco se conocen aquellos que controlan la migración celular, ni aquellos que regulan su diferenciación hacia un fenotipo requerido (Gould et al, 1977; Piche et al, 1989; Nanci y Bosshardt, 2006). Es por esto que es necesario identificar, aislar y caracterizar poblaciones celulares que expresen el fenotipo del cemento radicular.

A la fecha, sólo se conocen dos marcadores biológicos para el cemento radicular, CAP, que sirve como marcador putativo de las células progenitoras de cementoblastos (Liu et al, 1997; Arzate et al, 1998) y CEMP1 que es una proteína derivada del medio condicionante de un cementoblastoma humano. Se cree que estas dos proteínas pudieran estar relacionadas inmunológicamente. Los anticuerpos generados contra estas proteínas reconocen la capa cementoide, la capa cementoblástica, cementocitos, células progenitoras localizadas en la zona paravascular del

ligamento periodontal y en espacios endosteales del hueso, en cementoblastos putativos *in vitro*, células derivadas del folículo dental y células del ligamento periodontal humano (McCulloch, 1985; Alvarez-Perez et al, 2003; Bosshardt, 2005).

Debido a que no está bien dilucidado el papel que juega la CAP en el proceso de mineralización es importante su estudio, ya que este conocimiento contribuirá al entendimiento de los determinantes fundamentales de la regeneración de los tejidos periodontales y podría permitir el desarrollo de nuevas terapias para regenerar el periodonto.

D. ARN DE INTERFERENCIA.

Este hallazgo fue realizado en *Caenorhabditis elegans* demostrando la interferencia que se produce en la expresión génica mediante la introducción de ARN antisentido en las células (Fire et al., 1998). Desde 1990, y gracias a estudios en las plantas, se conoce que la unión de moléculas antisentido de DNA o ARN al mRNA bloqueaba su traducción. Lo diferente del estudio del grupo del Carnegie consistió en introducir en las células ARN de doble cadena (es decir, sentido y antisentido hibridizados). Ellos comprobaron que el efecto de silenciamiento génico era mucho más potente que con ARN de cadena sencilla ya que pocas moléculas de ARN de doble cadena bastaban para silenciar la expresión génica a pesar de la cantidad mucho mayor de mRNA existente en la célula.

Aunque el silenciamiento génico presenta diferencias en animales frente a hongos y plantas, los procesos moleculares son básicamente los mismos. La vía normal, fisiológica, de silenciamiento comienza cuando se expresa un pre-miRNA (*precursor micro-ARN*), una cadena sencilla que puede plegarse y formar una horquilla de doble cadena denominada miRNA. Otra posibilidad es la aparición de ARN de doble cadena que puede proceder de virus o transposones. En ambos casos estas cadenas dobles de ARN son cortadas por una enzima denominada “Dicer” en pequeños fragmentos (19 a 24 nucleótidos) de doble cadena con extremos 3’ salientes (2-3nucleótidos) denominados siRNAs (*short interfering RNA*). La caracterización de Dicer (Bernstein et al., 2001) permitió identificarla como una RNAsa III así como localizar en su estructura un dominio de unión a ARN de doble cadena.

Los siRNA producidos por Dicer se asocian con un complejo denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), activándolo y manifestando una actividad de helicasa que separa las dos hcadenas dejando solo la hcadena antisentido asociada al complejo. El complejo

ribonucleoproteico resultante se une al mRNA diana. Si la complementariedad no es perfecta, RISC queda asociado al mensajero y se atenúa la traducción. Pero si es perfecta, RISC actúa como RNasa, cortando al mensajero y quedando libre para repetir el proceso. Esto es lo que explica que un número pequeño de moléculas de siRNA pueden eliminar un número mucho mayor de mRNA.

También se ha puesto de manifiesto la existencia de dos complejos multiproteicos, uno formado por ARN-helicases, proteínas asociadas a ARN y otras ribonucleoproteínas, y otro complejo denominado "microprocesador" al que pertenecen las proteínas Drosha (una RNasa tipo III) y Pasha. (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004). El complejo microprocesador, situado en el núcleo celular, reconoce y corta los transcritos primarios denominados «miRNA primitivo» que pueden tener una longitud comprendida entre varios cientos y varios miles de bases. Así se generan los miRNA, cadenas en horquilla de unos 70 nucleótidos que serán procesados por Dicer.

Cualquier gen del que se sepa la secuencia puede ser la diana de un siRNA diseñado a medida con la secuencia complementaria a la de dicho gen. Por tanto, los siRNA constituyen una herramienta inestimable en el estudio de las funciones de los genes, en la validación de las dianas terapéuticas, en el estudio del mecanismo de acción de medicamentos o como terapia para enfermedades de origen genético(Carmell et al.,2003).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que el punto crítico para lograr la regeneración periodontal es la restauración de la inserción de las fibras del ligamento periodontal a las superficies radiculares y al hueso alveolar y que los tratamientos que existen a la fecha sólo logran la regeneración parcial, es importante ampliar el conocimiento que se tiene sobre la formación del cemento radicular, puesto que el proceso de la cementogénesis no es entendido en su totalidad. Es por esto que el conocimiento de la función de marcadores específicos del cemento, como CAP, podría servir para identificar, aislar y caracterizar el linaje cementoblástico y para determinar los mecanismos celulares y moleculares que regulan la cementogénesis durante el desarrollo y la vida adulta.

5. HIPÓTESIS.

El silenciamiento del ARN del gen CAP disminuirá la expresión a nivel transcripcional y traduccional de moléculas asociadas al proceso de la cementogénesis.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel regulador de la CAP durante el proceso de la cementogénesis *in vitro*, utilizando la estrategia de silenciamiento génico o ARN de interferencia.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Determinar la expresión a nivel transcripcional de CAP para establecer las consecuencias del silenciamiento génico.

-Observar los cambios que sufre la actividad enzimática de la ALP debido al silenciamiento de CAP.

-Estudiar la expresión a nivel traduccional de la CAP, sialoproteína ósea (BSP), proteína del cemento1 (CEMP1), y osteopontina (OPN) y analizar los cambios dados por el silenciamiento de CAP.

8. METODOLOGÍA.

A. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN DEL SIRNA PARA CAP Y TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CEMP.

Utilizamos cementoblastos putativos humanos que sobre-expresan CEMP1 ya que se demostró que estas células presentan un fenotipo mineralizante cementoblástico/osteoblástico y tienen una mayor tasa de proliferación. (Carmona *et al.*2007).

El protocolo para el silenciamiento génico mediante RNAi utilizado fue tomado del manual del usuario BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits, Gateway® -adapted expression vector for the expression of microRNA (miRNA) in mammalian cells under control of Pol II promoters. Version D (Invitrogen, USA).

El silenciamiento génico se logró mediante los siguientes pasos:

- Generación de oligos de doble cadena
- Ligación de los oligos en el vector de expresión.
- Transformación de *E. coli* mediante One Shot® TOP10 competent *E. coli*.
- Transfección a células CEMP.

Generación de los oligos de doble cadena

Se diseñaron 4 oligonucleótidos de DNA de cadena sencilla siguiendo el protocolo de BLOCK-IT POLII mi RNAi expression vectors (Invitrogen) (dos pares que son complementarios entre sí). Cada uno de los pares consta de una cadena codificante (cadena superior) para el pre miRNA blanco y una cadena complementaria (cadena inferior).

1. Secuencia 5´-3´CADENA SUPERIOR (10):

TGC TGT AGA AGG TGA GCC AGG CGG TGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC CAC
CGC CTC

Secuencia 5´-3´CADENA INFERIOR (11):

CCT GTA GAA GGT GAG AGG CGG TGG TCA GTC AGT GGC CAA AAC CAC CGC
CTG GCT CAC CTT CTA C

2. Secuencia 5´-3´CADENA SUPERIOR (12):

TGC TGT GAA CTA TCT CAA GCA AGG CAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TGC
CTT GCG AGA TAG TTC A

Secuencia 5´-3´CADENA INFERIOR (01):

CCT GTG AAC TAT CTC GCA AGG CAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TGC CTT
GCT TGA GAT AGT TCA C

Las secuencias blanco en el ADNc de CAP y los aminoácidos a los que corresponden se muestran en la figura 3.

Marco abierto de lectura..... ●
 Secuencia blanco de 10.11..... ●
 Secuencia blanco de 12.01..... ●
 Paro ●

```
GagagdtggctgCGCCGAGCCCCGTGCGCTGCAATGGGCGCCTGACGGAAGCGGCGGAGCGGGCAGCGGCT
CGGGTGCAGGCTGGGAGGGTCCCTCCACGCTCCTGCGCTGTCTCCACGTCGCCAGGTGCGGGCCACCATGGCT
CCAGCGACGAGGACGGACCAACGGCGGCGCTCGGAGGCCGGCGAGGACCGGGAGGCTCCCGGCGAGCGGAGGC
GCTGGGGTCTGCGCAACCGCTGGGCACTGATGACATCGCATGACCGGGGGTGGTGTCTAGCTATTGCCATGGT
ACGTTTTATATGAAAAAGGAACACACAGAGGTTATATAAAGTATTCAGAAAGACACTAAATTTCCAGACATTGCGCTGCT
GAGGTAAGTTTCCATCATGCTGTTTTCTATTGCTGTAATATTATGACATTTTGTGTGCAAAATCAATATGATTGCTGATTACAT
ACCACTATGGATTGCTGAATGCCAATGTTGACATGTTTATTAATGTTTCTATTGACGTAATGTTTTCTATTGCTACAGAT
AGTCACTGTTAATGGTGAGTTTTGCTCAATTTATACTTTATTATAAATGCTTAGGGCAATAGTCACTGTTTTCTTTAAGGAA
TTGTACTACTCTGTGATTGTGACTGGGTCAGTGAAGTCAAGAATCTTATGGTGTGCTCATTACTCACAGTATAAAACCGT
AAGTGACACAAACATGTTGCTACTGAGCCTGCAGGAAAGCTTCCATTCATAGGAATCAAATATTAACATTGTATATTAG
GAGGTGGAAGTGTGGACAAAAGGAGTGGGTTGAGTTTAGATGTTGTGACTAGTGCCTTAGCAGAAATGACTTGATA
CACAAACAAACCCAAATATTGGCATCTAGATCCGTAATATATCTCTTGATTTCCAGTTTTGAATCAGTATCAGGTTCTGC
AAATAACCTGCAGAAAATGTTCTTTCTATAGAAGTTCTTTCAATCCAAGTGTCTCTTGATTATGTAATCGAAGTGTGAGTAC
AATTTATTTCTGGCCAGCGCAGTGGCCACACCTGTAATCCAGCACTTGGGAGGCCAAGGCGGGTGGATCACCTGAGG
TCAGGAGTTGAGACCAGCTGGCCAACATGGTGAACCCCTGTCTACTAAAATACAAAAATTAACCGGCGTGGGGCG
AGCACCTGGAATCCAGCTACTCAGGAGGCCGAGGACAGAAAGATCGCTGAAACCCGAGAGGCAAGGTTGCAATGAGCTG
AGATTGTCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGACTCCGCTG
```

Figura 3. Secuencias blanco en el ADNc de CAP. La secuencia blanco de 10.11 corresponde a los aminoácidos TAWLTFY y la 12.01 a los aminoácidos ALLEV.

Se llevó a cabo el alineamiento de los oligonucleótidos de cadena sencilla para generar oligonucleótidos de doble cadena siguiendo el protocolo de BLOCK-IT POLII mi RNAi expression vectors (Invitrogen) utilizando los reactivos que se muestran en la tabla 3. Se montó la reacción de alineación en tubos de microcentrífuga de 0.5mL a temperatura ambiente y se incubó la reacción a 95°C por 4 minutos. Se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos mezclando gentilmente.

Tabla 3. Reactivos para la generación de oligos de doble cadena.

Reactivos	Cantidad
oligos de DNA Top strand (200 μ M)	5 μ L
Oligos de DNA Bottom strand (200 μ M)	5 μ L
10X Buffer de alineamiento de oligos	2 μ L
Agua libre de DNasa/RNasa	8 μ L
Volumen Total	20 μL

Ligación de los oligos dentro del vector de expresión

Se realizó la reacción de ligación en la que se clonaron los oligonucleótidos de doble cadena dentro de un vector pcDNA6.2-GW/ \pm EmGFP-miR. Se montó la reacción en el orden mostrado en la tabla 4. La reacción se incubó a temperatura ambiente por una hora.

Tabla 4. Reactivos para la ligación de los oligos dentro del vector pcDNA6.2-GW/ \pm EmGFP-miR

Reactivos	muestra
Buffer de ligación5X	4 μ L
pcDNA TM 6.2-GW/EmGFP-miR, linearizados (5 ng/ μ L)	2 μ L

oligos miR-ds (10 nM)	4 μL
Agua libre deDNasa/RNasa	9 μL
Ligasa T4 DNA (1 U/μL)	1 μL
Volumen Total	20 μL

Transformación de *E.coli* con One Shot® TOP10 competent *E. coli*

Una vez realizada la reacción de ligación se utilizaron células *E.coli* (One Shot TOP10) competentes químicamente (invitrogen, Calsbad, CA.) para transformar a las bacterias con el vector. Las bacterias transformadas son resistentes a la espectinomicina por lo que se crecieron en cajas de cultivo que contenían agar y 50 μ g/ml de espectinomicina.

Se eligieron dos colonias después de un día de crecimiento y se cultivaron. Se aislaron los plásmidos de DNA. Se secuenció cada pcDNA6.2-GW/ \pm EmGFP-miR para confirmar la presencia y orientación correcta de los oligonucleótidos de doble cadena insertado y para confirmar la secuencia del mismo. Se tomaron 20 μ L de la reacción de ligación y se colocaron en un vial de One Shot® TOP10 chemically competent *E. coli* (invitrogen, Calsbad, CA.) y se mezcló gentilmente. Se utilizó un volumen 10 veces mayor al recomendado en el manual del usuario para asegurara la transformación. Se incubó por 30 minutos. Las células fueron sometidas a choque térmico por 1 minuto. Se colocaron las células en medio SOC en hielo. Los tubos se colocaron en un agitador (200 rpm) por 1 hora a 37°C. Se tomaron colonias transformadas y se colocaron en placas de agar LB que contenían 50 μ g/mL de espectinomicina. se incubaron 1 día a 37°C.

Transfección

El plásmido resultante se transfectó en las células cementoblásticas humanas putativas utilizando lipofectamina 2000 (invitrogen, Calsbad, CA.) de acuerdo a las indicaciones del fabricante (tabla 5). Una vez que se comprobó su expresión correcta, se estableció una línea celular estable que expresara constitutivamente el miRNA. Esto se logró debido a que el pcDNA6.2-GW/± EmGFP-miR contiene un gen de resistencia a la blastidina por lo que se pudo realizar la selección de las células cementoblásticas que fueron transfectadas establemente al adicionar 10µg/ml de blastidina al medio por 12 días. Aproximadamente se usaron 1.7 µg de plásmido de DNA.

Tabla 5. Reactivos para la transfección.

Tubo A	Tubo B
10 µL de plásmido DNA	50 µL Lipofectamina
70 µL de reactivo Plus™ (Invitrogen)	250 µL SFM
220 µL SFM (medio libre de suero)	
Total 300 µL	Total 300 µL

Cada mezcla fue conservada por 15 minutos a temperatura ambiente. Después el contenido de los tubos se homogenizó y se dejó reposar por 45 minutos. Posteriormente la mezcla se adicionó al cultivo celular.

El proceso completo de construcción del vector y transfección se resume en la figura 4.

SILENCIAMIENTO GÉNICO

Los siRNA fueron diseñados para las secuencias diana de CAP

Secuencia 5'-3' TOP STRAND (10): TGC TGT AGA AGG TGA GCC AGG CGG TGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC CAC CGC CTC
 Secuencia 5'-3' BOTTOM STRAND (11): CCT GTA GAA GGT GAG AGG CGG TGG TCA GTC AGT GGC CAA AAC CAC CGC CTG GCT CAC CTT CTA C

Secuencia 5'-3' TOP STRAND (12): TGC TGT GAA CTA TCT CAA GCA AGG CAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TGC CTT GCG AGA TAG TTC A
 Secuencia 5'-3' BOTTOM STRAND (01): CCT GTG AAC TAT CTC GCA AGG CAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TGC CTT GCT TGA GAT AGT TCA C

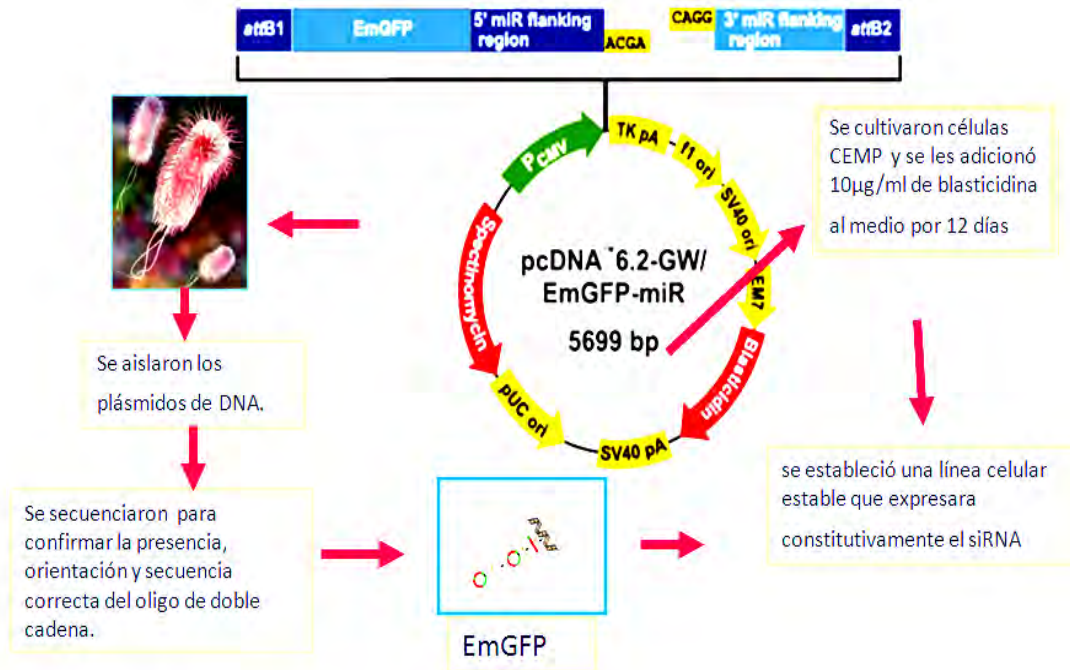


Figura 4. construcción del vector y transfección de éste a células cementoblásticas (CEMP) para lograr la expresión constitutiva de el siRNA de CAP.

B. CULTIVO CELULAR.

Ya establecidas las líneas celulares se cultivaron las células divididas en tres grupos:

- Grupo control células cementoblásticas (CEMP)
- Células cementoblásticas transfectadas con siRNA 10.11
- Células cementoblásticas transfectadas con siRNA 12.01 (los resultados fueron menos favorables en este grupo, por lo que decidimos eliminarlo del estudio)

Las células fueron cultivadas en cajas de 75cm². Las células se incubaron en un medio ambiente de 100% de humedad a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Las células se incubaron hasta 96 hrs en medio mineralizante que contiene 10% de suero fetal bovino (SFB), 10mM de β-glicerofosfato y 50μ/ml de ácido ascórbico. Para todos los procedimientos experimentales se usaron células entre el segundo o quinto pasaje.

C. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE FOSFATASA ALCALINA:

La actividad específica de fosfatasa alcalina se determinó de acuerdo al método de Lowry *et al.*, (1954) Las muestras se ensayaron bajo condiciones que aseguran la linealidad respecto al tiempo y a la concentración de proteína. Los tipos celulares se mantuvieron en cultivo durante 3, 7 y 14 días. La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método de Bradford (1976), utilizando BSA como estándar. Estos ensayos se realizaron por triplicado y repetidos al menos dos veces.

D. ENSAYO DE MINERALIZACIÓN:

Se realizó este ensayo con el fin de analizar cómo es que el silenciamiento de CAP cambia los grados de mineralización después de 3, 7 y 14 días. Se utilizó alizarina roja S al 2% para teñir los

nódulos de calcio insolubles formados en los cultivos celulares.. Estos ensayos se llevaron a cabo por triplicado y fueron repetidos al menos 2 veces.

A. EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL:

Las células se cultivaron y se recolectaron a los 3, 7 y 14 días. El ARN se extrajo utilizando trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante (invitrogen). El ARNm se convirtió a cDNA con la utilización de la transcriptasa reversa AMV (40 unidades; Promega) en un volumen total de 200 μ L e incubada a 42°C durante 1 hora. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó el primer ciclo durante 5 minutos a 95°C y para lograr la desnaturalización se realizaron 35 ciclos por 1 minuto a 95°C. El alineamiento fue a 55°C por 1 minuto, la extensión fue a 72°C por 1 minuto y un ciclo final de extensión a 72°C durante 0 minutos. Los transcritos se separaron en geles de agarosa al 2% conteniendo 400-ng/ml de bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de UV. Se utilizaron arrancadores para determinar la expresión de de CAP, y el marcador constitutivo GAPDH.

Este procedimiento metodológico se realizó por triplicado y fue repetido dos veces.

B. LA EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL TRADUCCIONAL:

Se determinó la expresión CAP, BSP, OPN y CEMP1 por medio de Western blot. Estos experimentos son necesarios para confirmar los cambios observados a nivel transcripcional ya que para estar presentes los cambios en el fenotipo, las proteínas necesitan estar presentes. Para esto, las células se sembraron por triplicado a una densidad de 5×10^4 en cajas de cultivo de 35 mm. Los cultivos experimentales y controles fueron cultivados durante 3, 7, y 14 días. A cada

término, las células se rasparon, se suspendieron en PBS y se centrifugaron. El botón celular se lisó en amortiguador de lisis (1 mM EDTA, pH 8.0), 10 mM Hepes, 50 mM NaCl, 0.5% Tritón X-100, 1 mM fenilmetilsulfonilfluoruro, 5 μ M leupeptina y 10 μ g/ml aprotinina). Se determinó la concentración de proteína y se cargaron cantidades iguales de proteína (10 μ g/línea) las cuales fueron sujetas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%. Las proteínas se transfirieron a membranas Immobilon-PVDF y se bloquearon con 5% de leche descremada y se incubaron con los anticuerpos primarios durante 1 hora, después de lo cual se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.1% 3x durante 10 min cada lavado y se incubaron con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa. Las membranas se lavaron como se describe y se revelaron con el kit ECL plus con quimioluminiscencia. Los blots se analizaron con el sistema Kodak de análisis de electroforesis y documentación (EDAS) 290. Los niveles relativos para cada proteína se determinaron midiendo la intensidad de los píxeles en cada banda, excluyendo el fondo local. Los resultados se expresaron como porcentajes de proteína respecto a los obtenidos en los cultivos controles. Los ensayos se realizaron por triplicado y fueron repetidos al menos dos veces.

C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos, resultado de la actividad específica, expresión relativa de ARNm y expresión relativa de los productos génicos de CAP, BSP, CEMP1 y OPN, se llevaron a cabo utilizando la prueba t de Student, utilizando el software GraphPad InStat.

9. RESULTADOS.

Transfección de CEMP con el RNAi.

La inserción de los oligonucleótidos 10.11 y 12.01 en el vector de expresión pcDNA™6.2-GW/±EmGFP-miR fue confirmada mediante la secuenciación del DNA del vector.

Se logró la detección de las células transfectadas, verificando la expresión de la EmGFP como se muestra en la figura 5, ya que es expresada cociestrónicamente con el miRNA de interés, por lo que hay un 100% de correlación de la expresión de la EmGFP y la actividad silenciadora del miRNA.

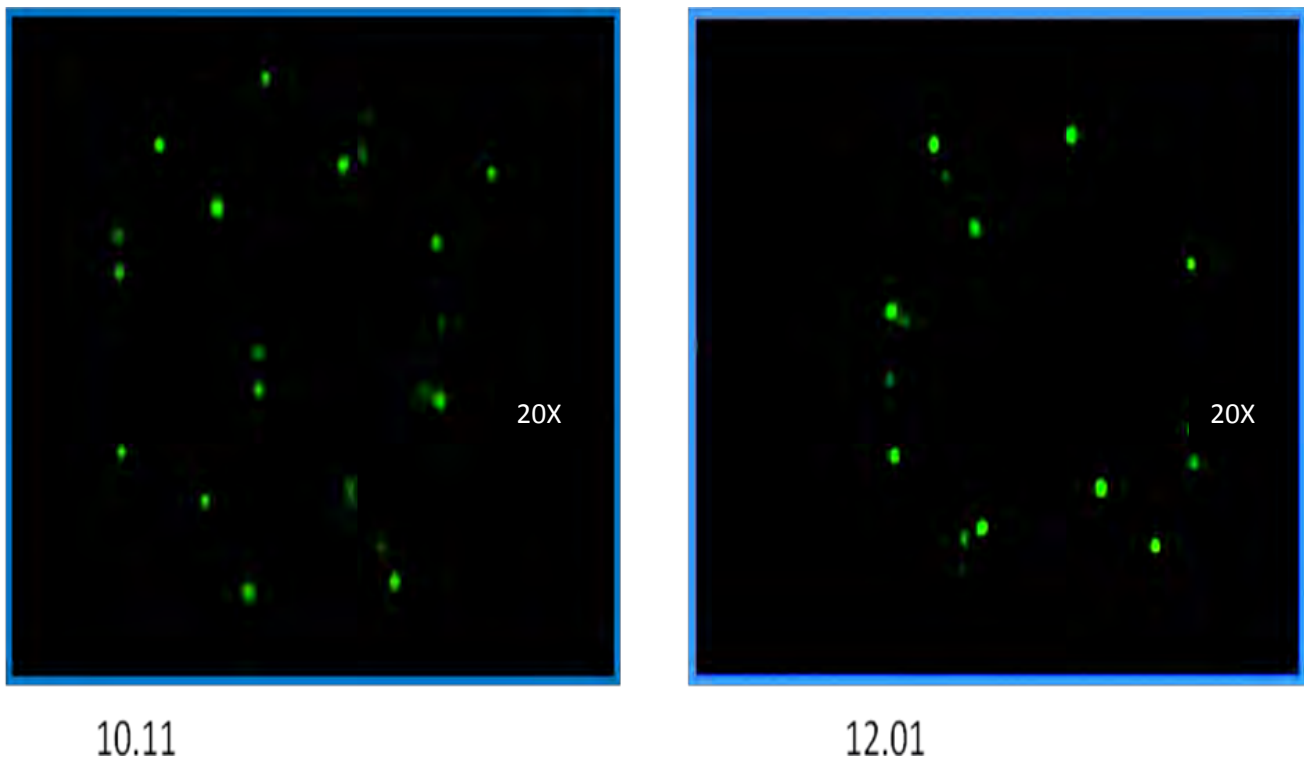


Figura 5. Detección de células transfectadas con el vector pcDNA™6.2-GW/±EmGFP-miR. Las células que poseen el vector se observa de un color verde brillante ya que la EmGFP es autofluorescente.

La actividad de la fosfatasa alcalina:

Las muestras fueron ensayadas bajo condiciones que aseguren la linealidad respecto al tiempo y a la concentración de proteína. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y los experimentales. La disminución en la actividad enzimática es evidente en el grupo 10.11, ya que se encontraron diferencias significativas en todos los días de cultivo. Se calculó el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática con respecto al grupo control a los 3, 7 y 14 días, reportándose aproximadamente 66,43 y 68% de inhibición respectivamente, tal como se muestra en la figura 6.

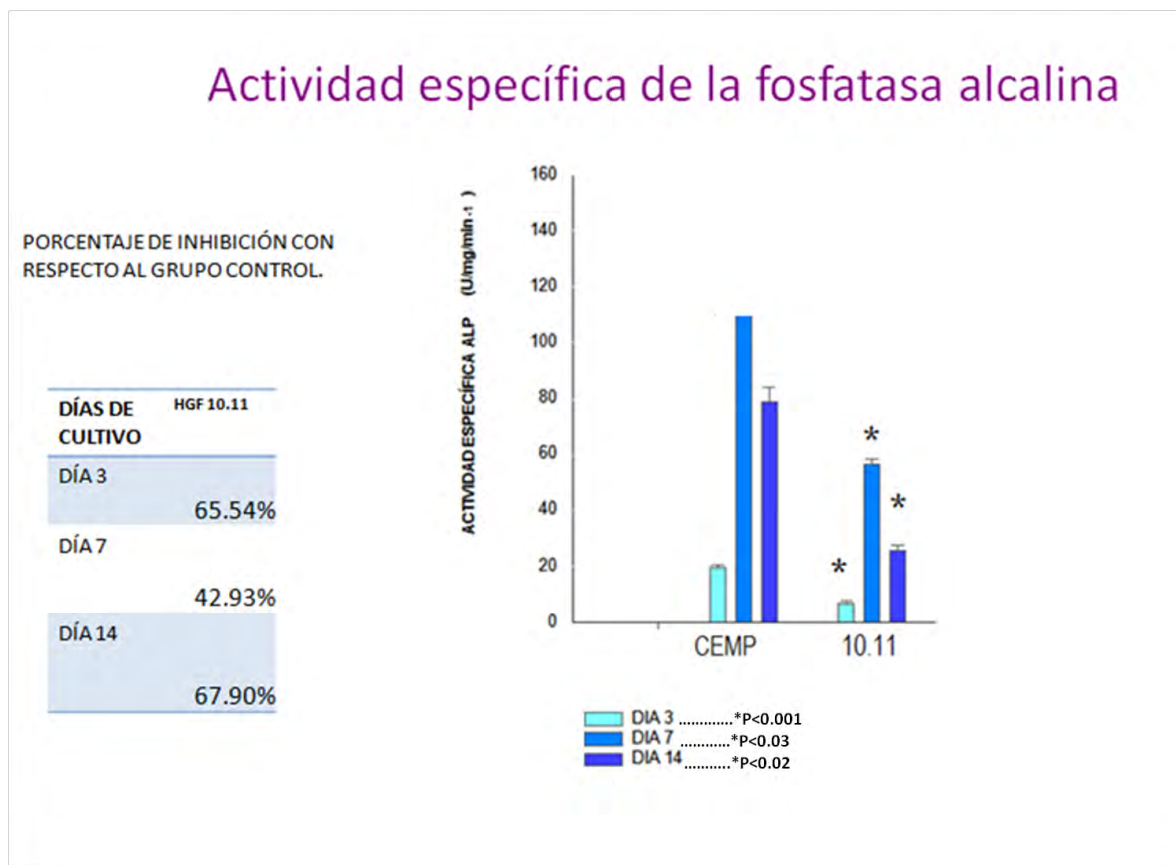


Figura 6. Determinación de la actividad de ALP. Se muestra una disminución sustancial de la actividad de la enzima. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa.

Ensayo de mineralización:

Se realizó este ensayo con el fin de analizar si el silenciamiento de CAP cambia los grados de mineralización después de 3, 7 y 14 días.

Se utilizó alizarina roja S para teñir los nódulos de calcio insolubles formados en los cultivos celulares (figura 7).

Los resultados indican que la formación de nódulos y la afinidad tintorial de la Alizarina roja S hacia el calcio disminuyó en las células transfectadas con el ARN de interferencia 10.11, a los 3, 7 y 14 días, por lo que es evidente que esta molécula participa en la regulación del proceso de biomineralización *in vitro*.



Figura 7. Ensayo de mineralización. Se utilizó alizarina roja S para teñir los nódulos de calcio insolubles formados en los cultivos celulares a los 3, 7 y 14 días.

Expresión génica a nivel transcripcional:

Se utilizaron arrancadores para la expresión de CAP y como control la GAPDH (figura 8). Se muestran diferencias significativas en el grupo con el silenciamiento de CAP tanto a los 3 como a los 14 días. Esto indica que el silenciamiento del gen produce una disminución de los transcritos, mostrando un porcentaje de inhibición de expresión mayor al día 3 con un 53.2% con respecto al control.

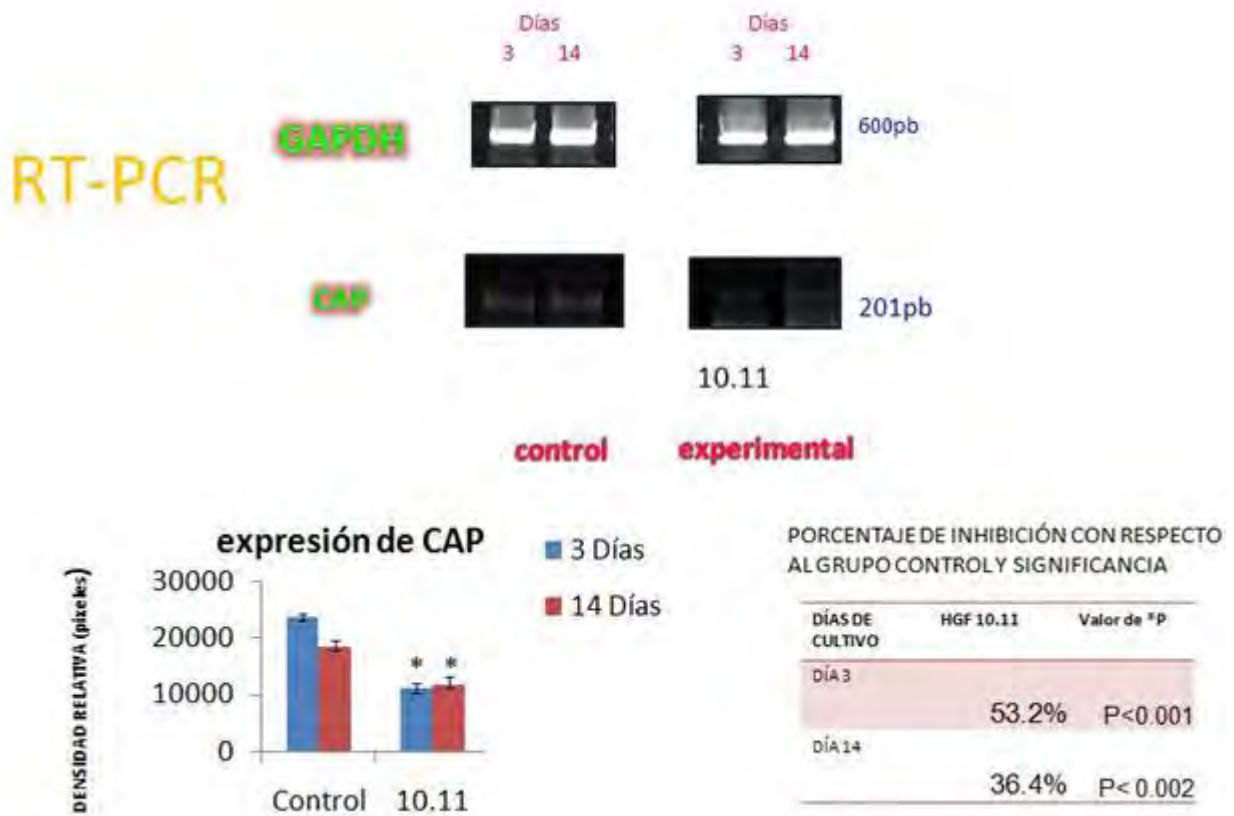


Figura 8. Arriba, los productos de la reacción de RT-PCR del ARNm de las células CEMP (control) y 10.11 (experimental), ambos, a los 3 y 14 días. Abajo, la gráfica de densidad relativa de las bandas (las diferencias significativas son mostradas con un asterisco) y el porcentaje de inhibición de expresión con respecto al grupo control.

La expresión génica a nivel traduccional:

Se determinó la expresión de CAP, BSP, OPN y CEMP1 por medio de Western blot (figura 9). Los niveles relativos para cada proteína se determinaron midiendo la intensidad de los píxeles en cada banda, excluyendo el fondo local.

CAP disminuyó casi totalmente su expresión en todos los tiempos probados, lo que nos indica que el producto final fue prácticamente silenciado.

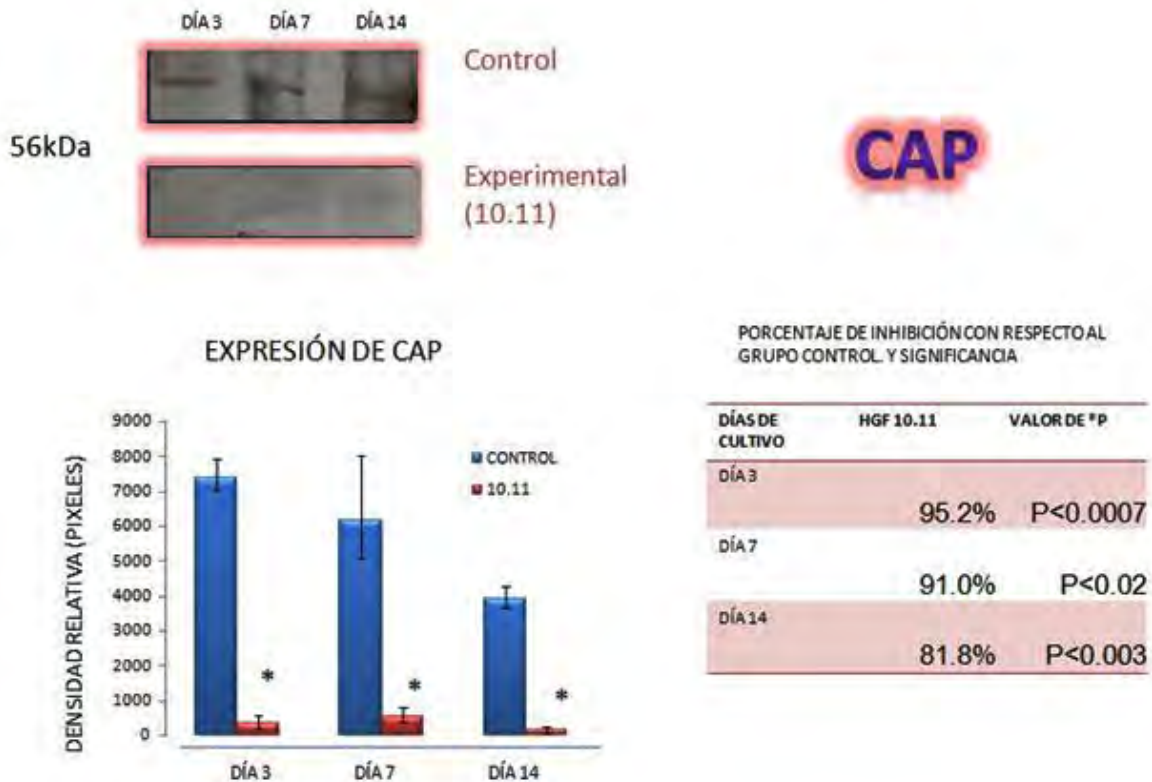


Figura 9. Arriba, detección de CAP por medio de Wester blot a los 3, 7 y 14 días. Abajo, la gráfica de densidad relativa de las bandas(las diferencias significativas son mostradas con un asterisco) y el porcentaje de inhibición de expresión con respecto al grupo control.

BSP disminuyó su expresión en un 48,6% a los 3 días, 69,2% a los 7 días y 76% a los 14 días de cultivo con respecto al control (figura 10). La diferencia fue significativa en todos los tiempos probados.

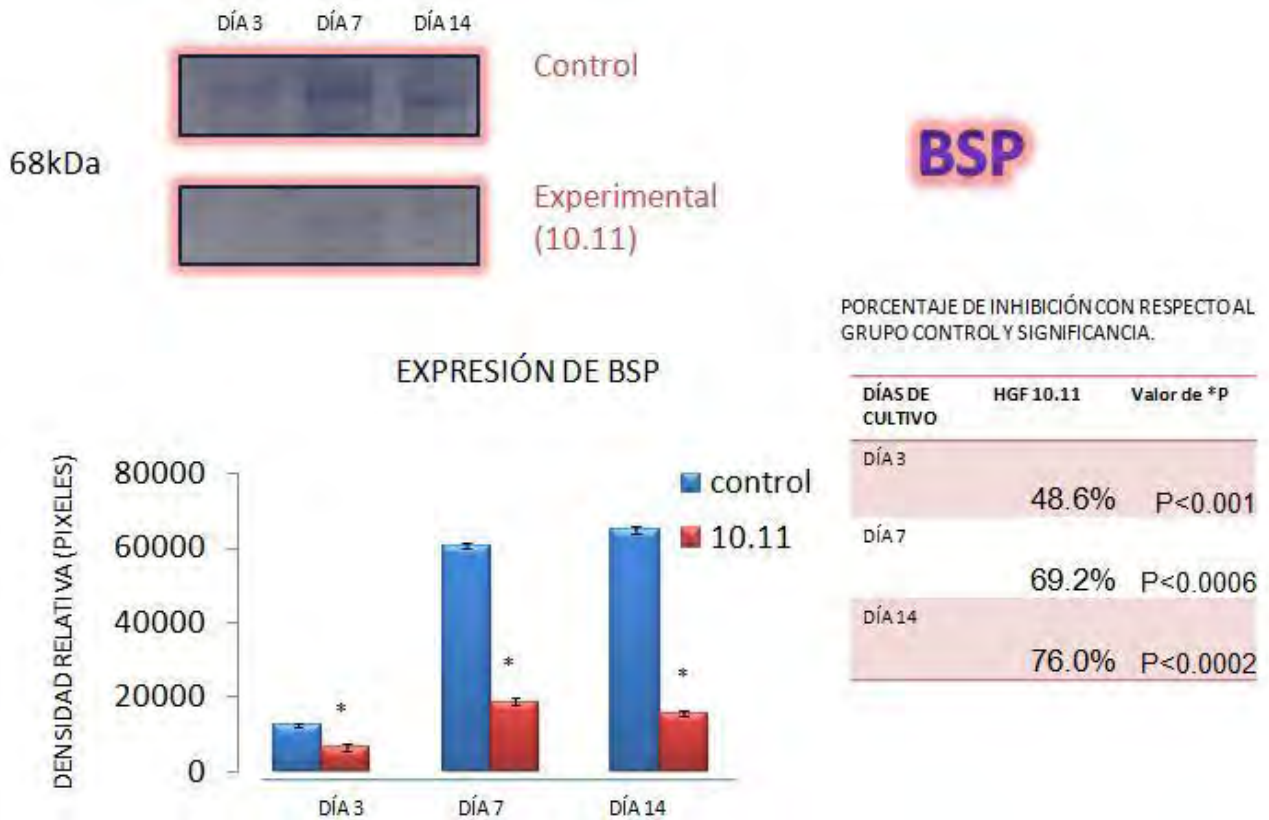


Figura 10. Arriba, detección de BSP por medio de Wester blot a los 3, 7 y 14 días. Abajo, la gráfica de densidad relativa de las bandas(las diferencias significativas son mostradas con un asterisco) y el porcentaje de inhibición de expresión con respecto al grupo control.

La proteína CEMP1 es uno de los marcadores biológicos del cemento radicular que ha mostrado desempeñar un papel importante en el proceso de la cementogénesis, particularmente en el proceso de biomineralización. Los resultados de este estudio demuestran que la expresión a nivel traduccional de CEMP1 es inhibida en un 78, 42 y 40% a los 3, 7 y 14 días de cultivo respectivamente. Las diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los tiempos probados como se indica en la figura 11.

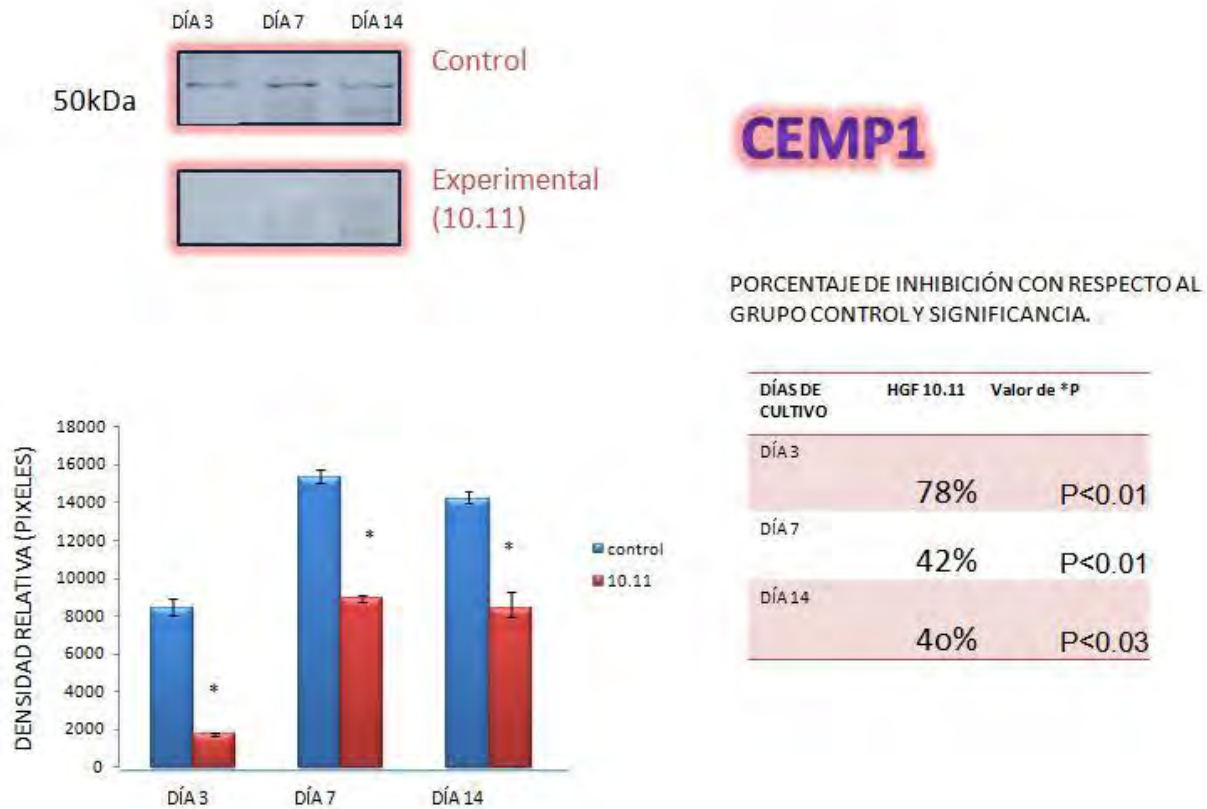


Figura 11. Arriba, detección de CEMP1 por medio de Wester blot a los 3, 7 y 14 días. Abajo, la gráfica de densidad relativa de las bandas (las diferencias significativas son mostradas con un asterisco) y el porcentaje de inhibición de expresión con respecto al grupo control.

La OPN es una de las moléculas que participan sustancialmente durante el proceso de mineralización y se ha determinado que juega un papel importante durante el proceso de la cementogénesis. Los resultados obtenidos en este estudio nos indican que la interferencia del ARN de la proteína de adhesión del cemento radicular afecta de un modo sensible la expresión de osteopontina ya que la expresión de este producto génico se observó inhibido en un 17, 16 y 43% a los 3, 7 y 14 días de cultivo respectivamente y respecto a los controles con una $p < 0.05$

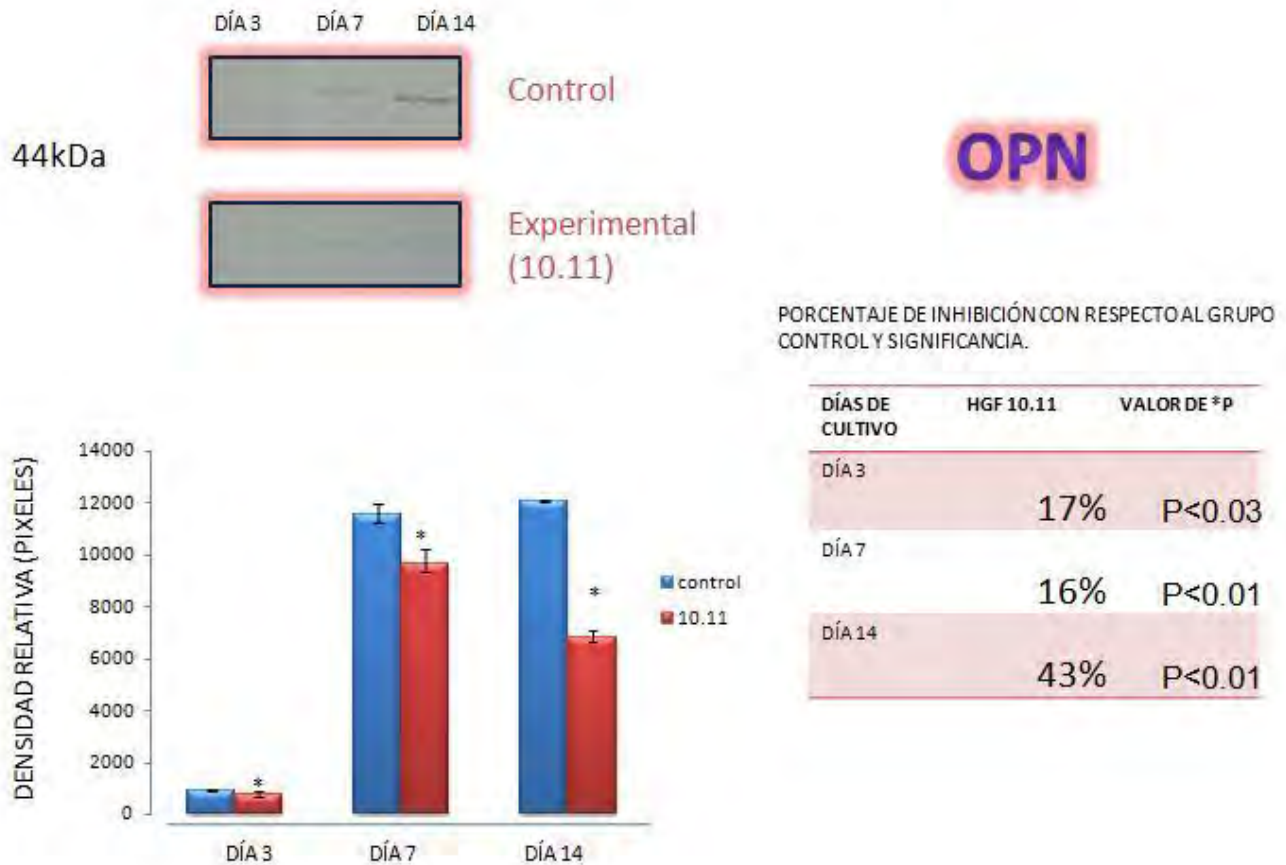


Figura 12. Arriba, detección de OPN por medio de Wester blot a los 3, 7 y 14 días. Abajo, la gráfica de densidad relativa de las bandas (las diferencias significativas son mostradas con un asterisco) y el porcentaje de inhibición de expresión con respecto al grupo control.

10. DISCUSIÓN

La investigación encaminada a la regeneración periodontal en los últimos años se ha enfocado de manera enfática al estudio de moléculas que se encuentran presentes en la matriz extracelular de los tejidos periodontales y en nuestro caso más específicamente del cemento radicular, con la finalidad de descubrir sus mecanismos de acción y su posible aplicación a la terapia periodontal (Shimono et al , 2003).

Los resultados de este estudio muestran consistentemente que se ha establecido una línea celular cementoblástica putativa que expresa constitutivamente el ARN de interferencia de la proteína de adhesión del cemento radicular humano (CAP). Esto es de suma importancia, ya que permite establecer un modelo para determinar el papel de la CAP durante el proceso de cementogénesis e indirectamente establecer el papel de las moléculas no-colágenas de la matriz extracelular presentes en tejidos mineralizados y su posible interacción con CAP.

Los resultados indican que el proceso de mineralización fue afectado y parcialmente inhibido en esta línea celular cementoblástica como resultado de la interferencia del ARN de la CAP, indicando que CAP se encuentra entre los factores que regulan la deposición de mineral de esta línea celular *in vitro*.

La interferencia del ARN de CAP influenció la actividad específica de ALP, la expresión de BSP, OPN y CEMP1, que son moléculas características de los estadios tempranos y tardíos de deposición de tejido mineralizado.

La inhibición del proceso de biomineralización se observó principalmente reflejada en la formación de nódulos mineralizados, ya que estos son un indicador del proceso de mineralización y también se reflejó en la afinidad tintorial a la alizarina roja S, la cual, a su vez tiene afinidad por las sales de calcio. Esta inhibición se dió de manera drástica desde los primeros días de cultivo, por lo que podríamos inferir que CAP participa en los estadios iniciales del proceso de mineralización.

La fosfatasa alcalina es una proteína que juega un papel general en el metabolismo del fosfato y en la formación de cemento radicular. Se asocia a la biomineralización tanto en la osteogénesis como en la cementogénesis por lo que su expresión y actividad se emplea como marcador de diferenciación temprana para las células formadoras de tejido mineralizado, ya que esta enzima es responsable de proveer los fosfatos necesarios para la formación de los fosfatos de calcio y también se ha demostrado que es esencial para la formación y crecimiento del cemento (Groeneveld et al, 1995; Liu et la, 1997; van den Bos y Beertsen, 1999). Sin embargo, su papel preciso durante el proceso de mineralización no ha sido completamente dilucidado (Linde, 1982).

La actividad de la ALP se relaciona con la mineralización inicial, y una vez que se ha establecido la síntesis de la matriz extracelular, la progresión posterior de la mineralización de la matriz previamente depositada, se asocia con la permanencia de la actividad de la ALP (Bianco, 1992). Nuestros datos experimentales revelan que la actividad de la fosfatasa alcalina se inhibió en 66, 43 y 68% respecto a los controles a los 3, 7 y 14 días respectivamente.

En adición a esto, previamente se ha demostrado que en ensayos de inhibición utilizando un anticuerpo anti-CAP, se afecta el grosor del tejido mineralizado por células cementoblásticas, observándose más delgado de acuerdo a los datos obtenidos con microscopia de fuerza atómica (Alvarez et al., 2003). Nuestros resultados apoyan reportes previos que indican una correlación entre la actividad específica de ALP y la cantidad y calidad del mineral depositado, otorgando a CAP un papel preponderante en la regulación de la actividad específica de esta proteína clave en el proceso de mineralización. Esta correlación positiva indica que mientras es más alta la actividad de ALP, mayor es el grosor del tejido mineralizado. A partir de aquí y debido al efecto del ARN de interferencia de CAP, podríamos asumir que esta molécula es esencial para el crecimiento continuo del cemento radicular (Beertsen et al., 1999; Groeneveld et al., 1995; van den Bos and Beertsen, 1999). Esto provee un soporte adicional de resultados previos que apuntan hacia las capacidades de esta molécula para promover la mineralización en células mesenquimatosas indiferenciadas (Arzate et al., 1996; Arzate et al., 1998).

Sabemos que CAP promueve diversas actividades biológicas tales como la migración a la superficie radicular con mayor afinidad para células del ligamento periodontal y del hueso alveolar que para fibroblastos gingivales (Olson *et al*, 1991; Pitaru et al, 1995; Metzger et al, 1998) y que afecta la diferenciación de células progenitoras de cementoblastos en el ligamento periodontal *in vitro* (Saito *et al*, 2001). Este estudio muestra que el silenciamiento del ARN de CAP realmente da como resultado la disminución de la expresión del producto final del gen. Nuestros hallazgos demuestran que los niveles de proteína de CAP disminuyeron a través de todos los periodos de cultivo, los cuales se inhibieron en un 95, 91 y 81% a los 3, 7 y 14 días

Se ha sugerido que las proteínas no-colágenas tales como la OPN y la BSP desempeñan un papel importante en el llenado de los espacios creados durante el ensamble de la colágena, dando cohesión al tejido mineral, permitiendo el depósito de mineral a través de las fibras de colágena (Bosshardt et al., 1998; Nanci, 1999). Sin embargo, los mecanismos por los cuales se logra el depósito de mineral no se entienden completamente a la fecha. Más concretamente, diversos autores sugieren que las fosfoproteínas son necesarias para la iniciación en la formación del cristal de hidroxiapatita (Roach, 1994), así como la organización de las fibras de colágena tipo I. Las mayores fosfoproteínas en el cemento radicular son OPN y BSP y son sintetizadas por los cementoblastos (Chen et al., 1991b; MacNeil et al., 1998; Shapiro et al., 1993).

Nuestros resultados revelan que la expresión de OPN a nivel traduccional fue inhibida en los cultivos experimentales durante los estadios iniciales de la mineralización *in vitro*. Ya que la OPN es expresada en altos niveles en los tejidos conectivos mineralizados (Bianco et al., 1991) y está relacionada al crecimiento inicial de los cristales de hidroxiapatita. Nuestros resultados sugieren que CAP regularía los estadios iniciales durante el proceso de mineralización. Este fenómeno podría explicarse del siguiente modo: La presencia de la osteopontina durante el crecimiento del cristal y su maduración, permitiría unir y potencialmente orientar cantidades significativas de Ca^{2+} sugiriendo que podría promover el proceso de mineralización (Butler et al., 1996; Gorski, 1992).

Sin embargo, la osteopontina es una proteína multifuncional y de hecho estudios *in vitro* apoyan el papel de esta molécula como un inhibidor de los cristales de oxalato de calcio en el riñón y en sistemas libres de células y actúa principalmente en el crecimiento del

cristal. Es de esperarse entonces que CAP participe como un factor homeostático durante el proceso de biomineralización.(Hunter et al., 1996). Se ha reportado que la OPN es abundante en los sitios de calcificación en las placas humanas ateroscleróticas y en válvulas aórticas calcificadas y no es encontrada en arterias normales (Butler et al., 1996). Sin embargo, la función de la OPN en la formación de los tejidos mineralizados, y en el recambio de estos no se ha determinado con claridad a la fecha. Así mismo, la inhibición del depósito de mineral durante el proceso de mineralización, no se puede atribuir exclusivamente a la OPN como un inhibidor del crecimiento del cristal. Cabe entonces considerar el posible papel de la fosfatasa alcalina y de CAP en la defosforilación de OPN, ya que se requiere la fosforilación de OPN para ejercer ya sea su efecto inhibitorio o promotor de la mineralización (Jono et al., 2000). En este sentido, la probable participación de CAP regulando la expresión de OPN nos puede llevar a concluir preliminarmente que CAP juega un papel preponderante durante el proceso de mineralización y que tiene participación en la regulación de la formación de los cristales de hidroxiapatita.

La sialoproteína ósea juega un papel importante durante la nucleación de los cristales de hidroxiapatita (Chen et al., 1991a, 1992b). La BSP tiene una asociación especialmente precisa con agregados minerales en estadios tempranos, se une fuertemente a la hidroxiapatita y actúa como un nucleador potente y específico para la formación de cristales de hidroxiapatita *in vitro* (Hunter and Goldberg, 1993). Nuestros hallazgos demuestran que los niveles de proteína de BSP disminuyeron considerablemente a través de todos los periodos de cultivo, los cuales se inhibieron 48, 69 y hasta 76%. Estos

resultados nos indican que CAP juega un papel de suma importancia en la regulación de la nucleación de los cristales de hidroxiapatita ya que inhibe la expresión a nivel de producto génico de este factor que juega un papel preponderante en la nucleación. Más importante aún, el proceso de nucleación del mineral y su crecimiento es probablemente inhibido en los cultivos experimentales debido a que CAP afecta la disponibilidad de OPN y ALP para regular la disposición de calcio (Fukayama and Tashijan, 1990), lo que explica en este estudio la disminución en la formación de nódulos mineralizados y en la tinción de las sales de calcio con alizarina roja S, lo que implica un retardo en el proceso de mineralización.

La proteína del cemento 1 (CEMP1) es una proteína novel que ha sido recientemente caracterizada y es marcador del cemento radicular. La proteína recombinante CEMP muestra reacción cruzada con anticuerpos contra colágena tipo X, esta especie es particularmente importante en el proceso de mineralización del cartílago hipertrófico. Asimismo el producto génico de CEMP1 se localiza en la matriz cementoide, cementoblastos, subpoblaciones celulares del ligamento periodontal y de un modo importante en células troncales localizadas paravascularmente en el ligamento periodontal (Alvarez et al., 2006).

Recientemente se ha presentado evidencia mostrando que CEMP1 juega un papel importante como regulador de la diferenciación de cementoblastos y la mineralización de la matriz extracelular que estos depositan *in vitro*. Así mismo la trasfección del gen que codifica para CEMP1 en células no esqueléticas como lo son los fibroblastos derivados del ligamento periodontal humano promueven el incremento en la síntesis de ALP, BSP,

OPN, OCN, CAP y el factor de transcripción Runx2/Cbfa1. Estas células transfectadas con CEMP1 indican que participa en el proceso de diferenciación y mineralización de células “no osteogénicas” tales como los fibroblastos derivados de encía humana y por lo tanto podría tener una función potencial en la formación de cemento y hueso (Carmona et al., 2007). De este modo esta proteína posee una fuerte afinidad por la hidroxiapatita, y más importante aún, se ha demostrado que CEMP1 juega un papel importante durante el proceso de biomineralización ya que promueve la nucleación de cristales de fosfato octacálcico, un precursor de los cristales de hidroxiapatita (Villarreal et al., 2009). Los resultados de este trabajo indican que la inhibición de CAP incide de una manera importante en los niveles de expresión de CEMP1. Esta inhibición se incrementa conforme transcurren los diferentes tiempos de cultivo. Esto podría interpretarse como una relación de sinergia entre CAP y CEMP1, ya que como se menciona anteriormente la función de CAP incide en los niveles de expresión de CEMP1 y posiblemente en sus funciones. Debido al modelo utilizado en este estudio (cementoblastos putativos humanos) y a que son los únicos marcadores biológicos del cemento radicular disponibles a la fecha estas dos moléculas parecen participar de un modo muy importante en el proceso de la cementogénesis, particularmente en la regulación de la expresión de moléculas asociadas a este proceso (OPN, BSP) y de CEMP1. Sin embargo son necesarios estudios futuros para determinar si el silenciamiento génico de CEMP1 incide en el mismo grado en la función de las moléculas anteriormente mencionadas y particularmente en la expresión y funciones de CAP.

Los hallazgos de este estudio nos ofrecen la posibilidad de explicar algunos de los eventos que regulan el proceso de la cementogénesis *in vitro*. Más aún, proveen nuevas vías para el diseño de estudios traduccionales con el propósito de lograr cementogénesis de novo y la regeneración de las estructuras periodontales de un modo predecible.

Nuestras observaciones refuerzan fuertemente el argumento de que CAP es responsable de regular el proceso de mineralización en cementoblastos putativos humanos. Además el análisis total de nuestros datos sugiere el papel inductor de CAP durante la biomineralización y consistente con esta idea, es notable la disminución de la actividad de ALP y de la expresión de los productos génicos de OPN, BSP y CEMP1 que se observará durante el desarrollo de la matriz extracelular mineralizada.

Son necesarios estudios adicionales son necesarios para determinar la significancia de CAP entre los factores que regulan la mineralización de la matriz extracelular del cemento radicular, ya que su papel específico no se puede determinar de una manera concluyente en este momento.

11. CONCLUSIONES

En este estudio se estableció una línea celular cementoblástica a la que se interfirió el ARN que codifica ara CAP de una manera estable.

Esta línea celular indica que la inhibición de ARN de CAP incide de una manera importante en la disminución de la actividad específica de la ALP, la expresión del producto génico de OPN, BSP y CEMP1, lo que en su conjunto ha incidido en la disminución del proceso de mineralización.

Los resultados sugieren que CAP podría desempeñar un papel sinérgico con CEMP1 en la regulación del proceso de la cementogénesis, ya que son los únicos marcadores biológicos de cemento radicular disponibles a la fecha.

Los resultados nos permiten inferir que CAP es un factor que por sus características, hacen de esta molécula un muy buen candidato para aplicaciones biotecnológicas con el objetivo de lograr la regeneración de cemento y/o hueso.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez-Perez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Rodriguez –Carmona B, Arzate H. Moleula cloning, espression anda immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). Bone 2006; 38: 409-419.

Alvarez-Pérez MA, Pitaru S, Alvarez Fregoso O; Reyes Gasca J, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization of cementoblastic cell line. J Struct Biol 2003; 143: 1-13.

American Academy of Periodontology. Academy Report. Position Paper. Periodontal regeneration. J. Periodontol 2005; 76: 1601-1622.

American Academy of Periodontology. Glossary of Periodontal Terms (2001) 4th edition.

Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, foster RA, Somerman Mj. Human periodontal cells iniciate mineral-like nodules *in vitro*. J Periodontol 1991; 62:499-503.

Arzate H, Alvarez-Perez MA, Aguilar Mendoza ME, Alvarez-Fregoso O. Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells *in vitro*. J Periodont Res. 1998:33;249-258.

Arzate H, Alvarez-Perez MA, Alvarez-Fregoso O, Wusterhaus-Chavez A, Reyes GascaJ, Ximenez-Fyvie LA. Electron microscopy, microanálisis and X ray diffracton characterization of mineral-like tissue deposited by humen cementum tumor-derived cells. J dent Res.2000:79; 28-34.

Arzate H, Alvarez-Perez MA, Narayanan AS: Cyclosporin A promotes mineralization by human cementoblastoma-derived cells in culture. J Periodont Res. 2005:40; 218-224.

Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernandez-Lagunas L, Diaz de Leon. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. J Periodont Res. 1996; 31: 144-148.

Arzate H, Jimenez-Garcia LF, Alvarez-Perez MA, Landa A, Bar-Kara I, Pitaru S. immunolocalization of human cementoblastoma-conditioned médium derived protein. J Dent Res. 2002.81;541-546.

Arzate H, Olson SW, Page RC, Narayanan AS. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in cuture. Bone and Mineral. 1992; 18: 15-30.

Arzate H, Portilla-Robertson J, Aguilar-Mendoza ME. Recombination of epithelial root sheath and dental papilla cells *in vitro*. Arch Med Res. 1996: 27;573-577.

Arzate H. Preliminary characterization of epithelial root sheath cells *in vitro*. Bil Est Med Biol Mex. 1994: 42;27-30.

Baab DA, Page RC, Morton T. studies of family manifesting premature exfoliation of deciduous teeth. J Periodontol. 1985: 56; 403-409.

Barmes DE: Public policy on oral health and old age: a global view. J Public Health Dent 2000: 60; 335-337.

Bar-Kana I, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S. Cementum attachment protein manifestation is restricted to the mineralized tissue forming cells of the periodontium. Eur J Oral Sci. 1998: 106 suppl 1; 357-364.

Bar-Kana I, Narayanan AS, Grosskop A, Savion N, Pitaru S. Cementum attachment protein enriches putative cementoblastic population on root surfaces *in vitro*. J Dent Res. 2000;79; 1482-1488.

Barnes DE. Public policy on oral health and age; a global View. J Public Health Dent 2000; 60; 335-337.

Bartold PM, Narayanan AS. Biology of periodontal connective tissues. Quintessence publishing Co, Inc 1998 Carol Stream, Illinois U.S.A.

Bartold. PM and Narayanan AS. Molecular and Cell Biology of healthy and diseased periodontal tissues. Periodontology 2000 2006;40; 29-49.

Bartold PM, Songtao S, Stan G. Stem cells and periodontal regeneration. Periodontology 2000 2006; 40;1664-1672.

Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of gingival. Periodontology 2000 2000; 24;28-55.

Beertsen W, McCulloch CAG, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissues. Periodontol 2000 1997;13; 20-40.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature. 2001 Jan 18;409(6818):363-6.

Berry JE, Zhao M, Jin Q, Foster LB, Viswanathan H; Somerman MJ. Exploring the origins of cementoblasts and their trigger factors. Connective tissue Research 2003; 44; 97-102.

Bianco, P., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D. and Robey, P. G. (1991) Calcif.Tissue Int. 49, 421-426

Bianco P; Silvestrini G; Ballanti P; Bonucci E Paramyxovirus-like nuclear inclusions identical to those of Paget's disease of bone detected in giant cells of primary oxalosis. Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology 1992;421(5):427-33.

Bianco, P., Riminucci, M., Silvestrini, G., Bonucci, E., Termine, J. D., Fisher, L. W. and Robey, P. G. (1993) J. Histochem. Cytochem. 41, 193-203

Birkedal-Hansen H, Butler WT, Taylor RE: proteins from the periodontium: Characterization of the insoluble collagens of bovine cementum. Calcif Tiss Res 1977;23; 39-44.

Bosshardt D D; Zalzal S; McKee M D; Nanci A Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. The Anatomical record 1998;250(1):13-33.

Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? J Dent Res 2005; 84; 390-406.

Bosshardt DD, Sculean A; Donos N, Lang P: pattern of mineralization after regenerative periodontal therapy with enamel matrix proteins. Eur J Oral Sci 2006; 114; 225-231.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annal Biochem 1976; 72; 248-254.

Bronkers ALJJ, Farach-Carson MC, Waveren EV Butler WT. Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin and dentin sialoprotein during root formation and early cementogenesis in the rat. J Bone Miner Res 1994; 9; 833-841.

Butler, W. T., Ridall, A. L., and McKee, M. D. (1996) Osteopontin, *in* Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., and Rodan, G. A. (Eds.), *Principles of Bone Biology*, pp. 167–181, Academic Press, San Diego.

Carmona-Rodríguez B, Álvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, García-Hernández AL, et al. (2007) Human cementum protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 358:763–769.

Carlson, S. 1990. Vertebrate dental structures. *In*: J.G. Carter (ed.), *Skeletal Biomineralization: Patterns, Process and Evolutionary Trends, Vol. 1*, 531–556. Van Nostrand Reinhold, New York.

Carmell, M. A., Zhang, L., Conklin, D. S., Hannon, G. J. & Rosenquist, T. A. Germline transmission of RNAi in mice. *Nature Struct. Biol.* 2003;10, 91-92 .

Chen J, Shapiro HS, Wrana JL, Reimers S, Heersche JNM, Sodek J (1991a) Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization. *Matrix* 11:133-143.

Chen J, Zhang Q, McCulloch CAG, Sodek J (1991b) Immunohistochemical localization of bone sialoprotein in foetal porcine tissues: comparison with secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) and SPARC (osteonectin). *Histochem J* 23:281-289.

Cheng H, Caterson B, Neame OJ, Lester G, Yamauchi M Differential distribution of lumican and fibromodulin in tooth cementum. *Connect Tiss Res* 1996; 34:87-90.

Christner P, Robinson P, Clarck CC. A preliminary characterization of human cementum collagen. *Calcif Tissue Int* 1997; 23; 147-150.

Cho MI, Lin WL, Genco RJ. Platelet-derived growth factors modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol* 1995; 66; 522-530.

Cho MI, Garant RP. Development and general structure of the periodontum. *Periodontology* 2000; 24: 9-27.

Cowles EA, De Dome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA. Mineralization and the expression of matrix proteins during *in vivo* bone development. *Calcif Tissue Int* 1998; 62; 74-82.

D'Errico JA, Macneil RL, Takata T, Berry J, Strayhorn C, Somerman MJ. Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, in situ and *in vitro*. *Bone* 1997;20; 117-126

Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F. and Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.

De Obarrio JJ, Aruz Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20:487-97.

Fukayama, S., and Tashjian, A.H., Jr. (1990). Stimulation by parathyroid hormone of ⁴⁵Ca²⁺ uptake in osteoblast-like cells: possible involvement of alkaline phosphatase. *Endocrinology* 126, 1941-1949.

Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998. 391:806-11.

Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialo- protein. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992;10:79–98.

Gao J, Symons AL, Bartold PM. 1998. Expression of TGF-β1 in the developing periodontium of rats. *J Dent Res*; 77:1708-1716

Garant PR. Oral cells and tissue. Quintessence Books (2003). Chapter 7: Root formation and cementogenesis. Quintessence Publishing Co, Inc. Chicago, Berlin, Tokyo; Copenhagen.

Gehron P. Cell-mediated calcification *in vitro*, in *Calcification in Biological Systems* (Bonucci, E., ed.), CRC, Boca Raton, FL, 1992: pp. 107–127.

Gestrelus S, Lyngstadaas SP, Hammarström L. Emdogain-periodontal regeneration based on biomimicry. *Clin Oral Invest* 2000; 4: 120-125

Giachelli CM, Schwartz SM, Liaw L: Molecular and cellular biology of osteopontin. *Trends Cardiovasc Med* 1995, 5:88-95

Giannobile WV, Finkelman RD; Lynch SE. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *Journal of periodontology* 1994;65(12):1158-68.

Giannobile William V; Somerman Martha J. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2003;8(1):193-204.

Gorski, J. P. (1992) Acidic phosphoproteins from bone matrix: A structural rationalization of their role in biomineralization, *Calcif. Tissue Int.* 50, 391–396.

Gottlow J; Nyman S; Lindhe J; Karring T; Wennström J New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *Journal of clinical periodontology* 1986;13(6):604-16.

Gould TR; Melcher AH, Brunette DM. Location of progenitor cell population in periodontal ligament after wounding. *Anat rec* 1977; 188: 133-41.

Greenstein G, Emdogain®: evidence of efficacy, *Compend Contin Educ Dent* 21 (2000), pp. 299–305

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 2004;329:77-84.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G. et al. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432: 235–240

Groeneveld MC, Everts V y Beertsen W: Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar. Its relation to cementum formation. *J Dent Res* 1995; 74: 1374-1381.

Grzesik WJ, Narayanan AS (2002) Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:474–484

Haase HR, Bartold PM. Enamel matrix derivative induces matrix synthesis by cultured human periodontal fibroblast cells. *J Periodontol.* 2001 Mar;72:341-8.

Hammarstrom L, Heijil L, Gestrelus S, Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J. Clin Periodontol* 1997; 24: 669-677.

Heard RH, Mellonig Jt. regenerative materials: an overview. *Alpha Omegan.* 2000;93(4):51–58. Review

Helder MN, Karg H, Bervoets TJM, Vukicevic S, Burger EH, D’O Souza RN. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) and tooth development. *J. Dental Res* 1998. 77, 545-554.

Ho SP, Sulyanto RM, Marshall SJ, Marshall GW. The cementum-dentin junction also contains glycosaminoglycans and collagen fibrils. *J Struct Biol.* 2005;151:69–78.

Howell T, Fiorellini JP, Pffenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol*, 1997; 68: 1186-93.

Huang KK., Shen, C., Chiang, C.-Y., Hsieh, Y.-D. and Fu, E. Effects of bone morphogenetic protein-6 on periodontal wound healing in a fenestration defect of rats. *Journal of Periodontal Research* 2005, 40: 1–10.

Hunter, GK, Kyle, CL and Goldberg, HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem. J.* 300, 723–728.

Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bonesialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(18):8562–5.

Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.* 1996;317:59–64

Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Diseases* 2006; 12(4): 358–363.

Ivanovski S, Li H, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 2001.36:131–141.

Ivanovski S, Komaki M, Bartold PM. Periodontal derived cells attach to cementum attachment protein via $\alpha 5 \beta 1$ integrin. *J Perios Res* 1999; 34: 154-159.

Jin, Q. M., Anusaksathien, O., Webb, S. A., Rutherford, R. B. and Giannobile, W. V. Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. *J. Periodontol* 2003. 74: 202–213.

Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem.* 2000;275:20197–20203.

Kagayama, M., Li, H., Zhu, J., Sasano, Y., Hatakeyama, Y. and Mizoguchi, I. Expression of osteocalcin in cementoblasts forming acellular cementum. *Journal of Periodontal Research* 1997, 32: 273–278.

Karting T, Nyman S, Gotlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration—animal and human studies. *Periodontol* 2000 1993: 1; 26-35.

King, G. N., King, N. and Hughes, F. J. (1998), Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration *in vivo*. *Journal of Periodontal Research*, 33: 226–236.

Kostopoulos, L. and Karring, T. (2004), Susceptibility of GTR-regenerated periodontal attachment to ligature-induced periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 31: 336–340.

Lian, J. B., Stein, G. S., Stein, J. L. and van Wijnen, A. J. (1998), Osteocalcin gene promoter: Unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 72: 62–72.

Linde A, Granström G (1980) Odontoblast alkaline phosphatase and Ca^{2+} transport. *J Biol Buccole* 6:293-308

Lindhe J. Periodontologia clínica e implantologia odontológica. En: Karting K, Lang KP Editores. Editorial médica panamericana. España 2003: 19-67.

Liu HW, Yacobi R., Savion N., Narayanan AS, Pitaru S. (1997). A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament. *J Bone Miner Res* 12:1691-1699.

Lowry OH, Roberts NR, WU ML, Hixon WS, Crawford EJ. The quantitative histochemistry of brain. II. Enzyme measurements. *J Biol Chem.* 1954 Mar;207(1):19–37.

Lynch SE, Ruiz de Castila G, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH: the effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1991; 62; 458-467.

Lysaght MJ, Nguy NA, Sullivan K. An economic survey of the emerging tissue engineering industry. *Tissue Eng.* 1998; 4; 231-238.

MacNeil R L; Berry J; D'Errico J; Strayhorn C; Piotrowski B; Somerman M J Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connective tissue research* 1995;33(1-3):1-7.

MacNeil R L; Berry J; Strayhorn C; Somerman M J Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis. *Archives of oral biology* 1996;41(8-9):827-35.

MacNeil RL, Berry JE, Strayhorn CL, Shigeyama Y, Somerman MJ. Expression of type I and XII collagen during development of the periodontal ligament in the mouse. *Arch Oral Biol.* 1998;43:779–787.

MacNeil R L; Thomas H F Development of the murine periodontium. I. Role of basement membrane in formation of a mineralized tissue on the developing root dentin surface. *Journal of periodontology* 1993;64(2):95-102.

MacNeil R L; Thomas H F Development of the murine periodontium. II. Role of the epithelial root sheath in formation of the periodontal attachment. *Journal of periodontology* 1993;64(4):285-91.

Matias MA, Li H, Young WG, Bartold PM. Immunohistochemical localization of fibromodulin in the periodontium during cementogenesis and root formation in the rat molar. *J Periodont Res* 2003; 38; 502–507.

Matsuura M, Herr Y, Han KY, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components of normal and healing periodontal tissues in the beagle dog. *J Periodontol.* 1995 Jul;66(7):579-93.

McAllister, B., Narayanan, A. S., Miki, Y. and Page, R. C. (1990), Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *Journal of Periodontal Research*, 25: 99–105.

McCulloch CAG. Progenitor cell population in the periodontal ligament of mice. *The anatomical record* 1985; 211: 258-262.

McCulloch, C. (1993), Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontology* 2000, 1: 16–25.

McCulloch, C. (1995), Origins and functions of cells essential for periodontal repair: the role of fibroblasts in tissue homeostasis. *Oral Diseases*, 1: 271–278.

McCulloch CA, Lekic P, McKee MD. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontol* 2000. 2000;24:56–72.

Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodontol* 1976;47:250-60

Metzger, Z., Weinstock, B., Dotan, M., Narayanan, A. S. and Pitaru, S. (1998), Differential chemotactic effect of cementum attachment protein on periodontal cells. *Journal of Periodontal Research*, 33: 126–129

Nakashima Misako; Reddi A Hari The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nature biotechnology* 2003;21(9):1025-32

Nanci A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol* 1999; 126:256–269

Nanci A y Bosshardt DD. Structure of periodontal tissue in health and disease. *Priondontology* 2000 2006; 40: 11-28.

Newman MG, Takei HH, Carranza. *Periodontología clínica*. 2003. Ed. Mc Graw-Hill, 9a ed.

Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe, J. (1982), The regenerative potential of the periodontal ligament. *Journal of Clinical Periodontology*, 9: 257–265.

Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Platelet rich plasma contains high levels of platelet derived growth factors and transforming growth factor beta and modulates the proliferation of periodontal related cells *in vitro*. *J Periodontal* 2003;74:849-57.

Olson S., Arzate H., Narayanan AS, Page RC (1991). Cell attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition. *J Dent Res* 70:1272-1277

Orban, B.: The epithelial network in the periodontal membrane. *J. Am. Dent. Assoc.* 1952 44: 632-635,.

Park JB, Matsuura M., Han KY, Norderyd O, Lin WL, Genco RJ, et al. (1995). Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J Periodontol* 66:462-477.

Paynter KJ, Pudy G. A study of the structure, chemical nature and development of cementum in the rat. *Anat Rec*1958:131:233-51.

Piche JE, Carnes DL, Graves DT: initial characterization of cells derved from human periodontium. *J Dent Res* 1989; 8:761-7.

Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan AS. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontol Res* 1994; 29:81-94.

Pitaru S, Narayanan AS, Olson S, Savion N, Hekmati H, Alt I, Metzger Z. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodont Res* 1995;30:360-8.

Pitaru S., Kotev-Emeth S., Noff D., Kapfulerr S., Savion N. (1993). Basic fibroblast growth factor stimulates mineralized bone-like tissue formation *in vitro* by enhancing the proliferation, differentiation and protein synthesis of stromal bone marrow cells. *J Bone Miner Res* 8:919-929.

Pitaru S., Melcher AH (1983). Orientation of gingival fibroblasts and newly-synthesized collagen fibers *in vitro*. Resemblance to transseptal and dento-gingival fibers . *J Periodont Res* 13:483-500.

Pitaru S; Pritzki A; Bar-Kana I; Grosskopf A; Savion N; Narayanan A S. Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *Connective tissue research* 2002;43(2-3):257-64.

Pitaru S., Savion N., Hekmati H., Olson S., Narayanan AS (1992). Binding of a cementum attachment protein to extracellular matrix components and to dental surfaces. *J Periodont Res* 27:640-646.

Rincon, J. C., Young, W. G. and Bartold, P. M. (2006), The epithelial cell rests of Malassez – a role in periodontal regeneration?. *Journal of Periodontal Research*, 41: 245–252.

Ripamonti U, Reddi AH. Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 1997;8(2):154-63.

Rittling SR, Denhardt DT. Osteopontin function in pathology: Lessons from Osteopontin- deficient mice. *Exp. Nephrol.* (1999) 96:103–113.

Roach HI. Why does matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. *Cell Biol Int* 1994; 18:617-627

Rutherford RB, Niekrash CE, Kennedy JE, Charette MF (1992). Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodont Res* 27:285-290.

Rutherford RB, Ryan ME, Kennedy JE, Tucker MM, Charette MF (1993). Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol* 20:537-544.

Saito M, Narayanan AS (1999). Signaling reactions induced in human fibroblasts during adhesion to cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res* 14:65–72.

Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, et al. (2001). Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 29:242–248.

Sato, Y., Kikuchi, M., Ohata, N., Tamura, M. and Kuboki, Y.: Enhanced cementum formation in experimentally induced cementum defects of the root surface with the application of recombinant basic fibroblast growth factor in collagen gel *in vivo*. *J. Periodontol.* 75: 243-248, 2004

Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell Biology of cementum. *Periodontol* 2000 2000_24: 73-98.

Sela J, Schwartz Z, Swain LD, Boyan BD: the role of matrix vesicles in calcification. En Bonucci . *Calcification in Biological systems*. Florida, U.S.A. CRS press. 1992.

Sena K, Morotome Y, Baba O, Terashima T, Ishikawa I. Gene expression of growth differentiation factors in the developing periodontium of rat molars. *J Dent Res* 2003;82; 166-171.

Shapiro, H. S., Chen, J., Wrana, J. L., Zhang, Q., Blum, M. and Sodek, J. (1993) *Matrix*13, 431-440

Shimono M, Ishikawa T, Isikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K e Inoue T. regulatory mechanisms of periodontal regeneration, *Microscopy Research and technique* 2003; 60: 491-502.

Schroeder HE. Biological problems of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. In: Friedman J, editor. *Int Rev Cytology* 1993; 142:1-59

Schroeder HE. Human cellular mixed stratified cementum: a tissue with alternating layers of acellular extrinsic and cellular intrinsic fiber cementum. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1993;103:550–560.

Sculean A, Donos N, Brex M, et al. Treatment of intrabony defects with guided tissue regeneration and enamel-matrix-proteins. An experimental study in monkeys. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 466-72.

Sculean A, Donos N, Windisch P, et al. Healing of human intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins or guided tissue regeneration. *J Periodontal Res* 1999; 34: 310-22.

Sculean A, Chiantella GC, Windisch P, et al. Clinical and histologic evaluation of human intrabony defects treated with enamel matrix protein derivative (Emdogain). *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20: 374-81.

Slavkin H C; Bessem C; Fincham A G; Bringas P; Santos V; Snead M L; Zeichner-David M Human and mouse cementum proteins immunologically related to enamel proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1989;991(1):12-8.

Somerman M J; Perez-Mera M; Merkhofer R M; Foster R A *In vitro* evaluation of extracts of mineralized tissues for their application in attachment of fibrous tissue. *Journal of periodontology* 1987;58(5):349-51.

Somerman M J; Sauk J J; Foster R A; Norris K; Dickerson K; Argraves W S Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *Journal of periodontal research* 1991;26(1):10-6.

Somerman M J; Shroff B; Argraves W S; Morrison G; Craig A M; Denhardt D T; Foster R A; Sauk J J Expression of attachment proteins during cementogenesis. *Journal de biologie buccale* 1990;18(3):207-14.

Swanson EC, Fong HK, Foster BL, Paine ML, Gibson CW: amelogenins regulate expression of genes associated with cementoblasts *in vitro*. *Eur J oral Sci* 2006; 114: 239-243.

Thesleff Irma Developmental biology and building a tooth. Quintessence international (Berlin, Germany:1985) 2003;34(8):613-20. Thomas, H.F. (1995) Root formation. *Int J Dev. Biol* 39: 231–237

van den Bos, T. and Beertsen, W. (1999), Alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament: age effect and relation to cementum growth rate. *Journal of Periodontal Research*,

van den Bos T, Handoko G, Niehof A, Ryan LM, Coburn SP, Whyte MP, Beertsen W. Cementum and dentin in hypophosphatasia. *J Dent Res.* 2005 Nov;84(11):1021-5.

Viswanathan HL, Berry JE, Foster BL, Gibson CW, LiY, Kulkarni AB. Amelogenin: A potent regulator of cementum associated genes. *J Periodontol* 2003; 74: 1423-1431.

Villarreal-Ramírez, Moreno, Mas-Oliva, Chávez-Pacheco, Narayanan, Gil-Chavarría, Zeichner-David and Arzate. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (*hrCEMP1*): Primary role in biomineralization. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*2009 384:1, 49-54.

Weiner, Traub, Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS Lett.* 206 (1986), pp. 262–266.

Whyte MP. Alkaline phosphatase: physiological role explored in hypophosphatasia. In Peck WA, ed. *Bone and mineral research*. Amsterdam: Elsevier, 1989:175

Wilson TG Jr. Safety testing of Emdogain. In: Wilson TG Jr, ed. *Periodontal Regeneration Enhanced-Clinical Applications of Enamel Matrix Proteins*. Chicago: Quintessence Publishing Co., Inc.; 1999:23-25.

Wu DY, Ikezawa K, Parker T, et al. Characterization of a collagenous cementum derived attachment protein. *J Bone. Min Res* 1996;11:686-692

Yamamoto H, Cho SW, Kim EJ, Kim JY, Fujiwara N, Jung HS. Developmental properties of the Hertwig's epithelial root sheath in mice. *J Dent Res.* 2004 Sep;83(9):688-92.

Yamashiro T, Tummers M, Thesleff I. Expression of bone morphogenetic proteins and Msx genes during root formation. *J Dent Res.* 2003 Mar;82(3):172-6.

Zeichner-David Maggie; Chen Li-Sha; Hsu Zhengyan; Reyna Julia; Caton Javier; Bringas Pablo Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells. *European journal of oral sciences* 2006;114 Suppl 1():244-53; discussion 254-6, 381-2.

Zeichner-David Margarita Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontology* 2000 2006;41():196-217.

Zeichner-David, M., Oishi, K., Su, Z., Zakartchenko, V., Chen, L. S., Arzate, H. and Bringas, P. Jr.: Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev. Dyn.* 228: 651-663, 2003

Zhao M, Berry JE, Somerman MJ. Bone morphogenetic protein-2 inhibits differentiation and mineralization of cementoblasts *in vitro* *J Dent Res* 2003; 82; 23-27.