



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**DETERMINACIÓN DEL PAPEL INDIVIDUAL Y/O SINERGÍSTICO DE
CEMP1 Y CAP EN EL PROCESO DE MINERALIZACIÓN *IN VITRO*
UTILIZANDO ARN DE INTERFERENCIA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

SANTA RITA ARROYO CRUZ

TUTOR:

**DR. HIGINIO ARZATE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2013



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.

*“Los conceptos y principios fundamentales de la ciencia son
invenciones libres del espíritu humano”*

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas para formarme profesionalmente, por brindarme toda la grandeza de su institucionalidad y por ser orgullosamente parte de sus universitarias.

Al Dr. Higinio Arzate por abrirme las puertas de su laboratorio, por haberme guiado para la consolidación de este proyecto y por darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

A los miembros del jurado de mi examen de grado Dra. Patricia Tato Zaldívar, Dra. Elba Rosa Leyva Huerta, Dra. Gabriela Mercado Celis y Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez. Agradezco su atención y tiempo para leer mi tesis y darme sus comentarios. Todos ellos muy valiosos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
ANTECEDENTES.....	9
PERIODONTO.....	9
ENCÍA.....	9
LIGAMENTO PERIODONTAL.....	11
HUESO ALVEOLAR.....	12
CEMENTO RADICULAR.....	13
CEMENTOGÉNESIS.....	14
COMPOSICIÓN DEL CEMENTO.....	15
CEMP1.....	17
CAP.....	19
ALP.....	21
BSP.....	21
AMEL.....	22
AMBN.....	22
BIOMINERALIZACION.....	23
ARN DE INTERFERENCIA.....	24
TIPOS DE ARN DE INTERFERENCIA.....	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	28
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS GENERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
RESULTADOS.....	38
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	56
REFERENCIAS.....	57

RESUMEN

El cemento es un tejido clave para la inserción de las fibras del ligamento periodontal en las superficies radiculares, contiene factores relevantes en la formación y regeneración de tejidos periodontales. La constitución del cemento está determinada por 50% de matriz inorgánica principalmente conformada por fosfatos de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{12}]$ y el otro 50% está conformado por matriz orgánica que contiene principalmente colágena tipo I y III, y en menor proporción la colágena tipo V, VI y XII. Existen proteínas no colágenas que se ven involucradas en el proceso de mineralización, durante la formación radicular, entre las que se encuentran la sialoproteína ósea (BSP), proteínas de la matriz dentinaria-1 (DMP-1), sialoproteína dentinaria, fibronectina, osteonectina, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanos y factores de crecimiento. Estudios han revelado que existen proteínas contenidas en la matriz orgánica del cemento, que son específicas como la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento (CAP) que se expresa en poblaciones de cementoblastos.

El ARN de interferencia se ha convertido en un método eficaz para silenciar genes específicos. El silenciamiento por ARN es un mecanismo altamente conservado por la naturaleza, en que moléculas de ARN de doble cadena (dsRNA) regulan la expresión de genes. Las alternativas experimentales como el silenciamiento en la expresión génica de las moléculas cemento específicas CEMP1 y CAP, contribuirán al mejor entendimiento de la cementogénesis.

Se reconoce que aún hay aspectos importantes que no han sido descritos sobre las condiciones moleculares determinantes que hacen que el proceso de mineralización sea dirigido para permitir la reparación y aún más allá, la regeneración de las estructuras de soporte que han sido dañadas. Si bien es cierto que marcadores individuales en cementoblastos como CAP y CEMP1, sirven como punto de partida para entender el proceso de mineralización, aún falta verificar si entre estas proteínas existe un factor sinérgico que permita dilucidar el mecanismo de mineralización en cementoblastos y el impacto que este sinergismo

tendría en el resto de proteínas no colágenas que también participan en la regulación y dirección de este proceso. Para tal efecto, en este estudio se caracterizo el mecanismo individual y sinérgico de estas proteínas mediante silenciamiento génico por ARN de interferencia para CAP y CEMP-1.

Hipótesis. CEMP-1 y CAP son proteínas específicas de cemento involucradas en el proceso de mineralización por lo cual al silenciar el gen que regula la expresión de dichas proteínas, el proceso de mineralización se verá alterado.

Objetivo: Determinar los efectos en la expresión génica y traduccional en el proceso de mineralización utilizando ARN de interferencia de CAP, CEMP1 y CAP/CEMP-1.

Materiales y Métodos: Cultivo celular de cementoblastos en DMEM 10%SBF; Construcción del vector de expresión del RNAi para CAP y CEMP-1; Purificación del plásmido del RNAi de CAP y CEMP-1; Transfección estable de cementoblastos con lipofectamina y selección de clonas; Expresión génica a nivel transcripcional y traduccional mediante de qRT-PCR y Western blot, respectivamente; Ensayos de mineralización y Ensayos de actividad enzimática para ALP.

Resultados: El ARN de interferencia de CEMP1 y CAP disminuyen la expresión de genes de proteínas específicas del cemento CEMP1 y CAP además de otros genes de proteínas no colágenas implicadas en el proceso de mineralización como ALP, BSP, AMEL y AMBN desde periodos cortos de tiempo.

Conclusiones: El ARN de interferencia de CAP tiene mayor efecto en el silenciamiento de expresión génica y traduccional respecto al ARN de interferencia de CEMP1, sin embargo al utilizar ambos ARN de interferencia existe un efecto sinérgico donde posiblemente sea CAP donde residen los mecanismos moduladores.

ABSTRACT

The cementum is a key tissue for periodontal ligament fibers insertion on the root surfaces, contains relevant factors for regeneration and formation of periodontal tissues. The cementum constitution is determined by 50% inorganic matrix composed mainly of calcium phosphate crystals in a hydroxyapatite form $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{12}]$ and the other 50% is made up by organic matrix containing mainly collagen type I and III, and type V, VI, XII in a lesser extent. There are non-collagenous involved in the mineralization process, during root formation, among which are bone sialoprotein (BSP), dentin matrix protein -1 (DMP-1), dentin sialoprotein, fibronectin, osteonectin, osteopontin, proteoglycans and growth factors. Studies have revealed that there are cementum specific proteins contained in the organic matrix as the cementum protein (CEMP-1) and the cementum adhesion protein (CAP) which is expressed on cementoblast populations.

Interference RNA has become an effective method to silence specific genes. RNA silencing is a highly conserved mechanism by nature; in which double-stranded RNA molecules (dsRNA) regulate gene expression. The experimental alternatives like genetic expression silencing of cementum-specific proteins CEMP1 and CAP will contribute to a better understanding of cementogenesis.

It is recognized that there are still important issues that have not yet been described on the molecular determinants conditions which cause the mineralization process being directed to allow the regeneration and repair of the support structures that have been damaged. While it is true that the individual markers in cementoblast, as CAP and CEMP1, serve as a starting point for understanding the mineralization process, remains to see if between these proteins there are a synergic factor that allows the elucidation of the mineralization mechanism on cementoblast and the synergic impact that would take on the remaining non-collagenous proteins that are also involved in the direction and regulation of this process. To envision this, in the present study it was characterized the individual and synergic mechanism of these proteins through gene silencing by interference RNA of CEMP1 and CAP.

Objective: To determine the effects on the gene and traductional expression during the mineralization process by using iRNA from CAP, CEMP and CAP/CEMP1.

Materials and Methods: Cementoblast cells were cultured in DMEM/10% FBS; Construction of iRNA from CAP and CEMP1 expressing vector, plasmid purification of the iRNA from CAP and CEMP1, stable transfection into cementoblast cells with lipofectamine and clone selection, gene expression at transcriptional and traductional levels trough qRT PCR and Western Blot respectively, mineralization assays and enzymatic activity assay for ALP.

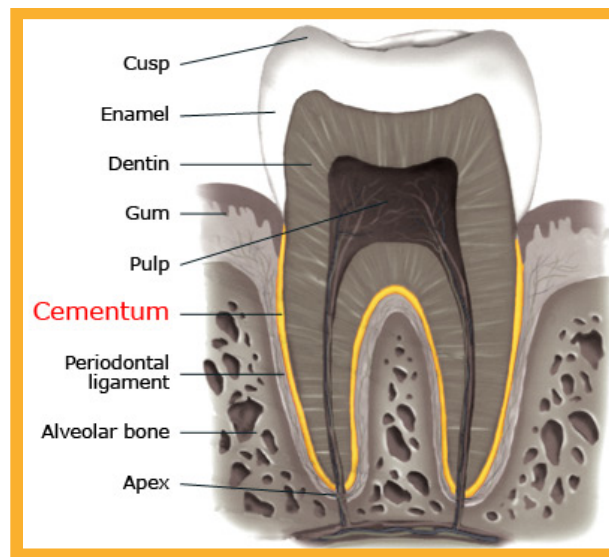
Results: The interference RNA from CEMP1 and CAP decreases gene expression from specific cementum proteins (CEMP and CAP) and from other non-collagenous proteins genes involved in the mineralization process such as: ALP, BSP, AMEL, AMBN.

Conclusions: The interference RNA from CAP have a major effect on gene and traductional expression using CEMP1 interference RNA, however, RNA1 of both, results in a synergistic effect where possibly is CAP the molecule that regulates these mechanisms.

ANTECEDENTES

PERIODONTO

El periodonto es el conjunto de tejidos dinámicos que tiene como función dar soporte a los órganos dentales dentro de su alvéolo, distribuir las fuerzas de la masticación, ayudar a la fonación, proveer un reservorio de células para la homeostasis y la regeneración o reparación del tejido y proteger la raíz dental. Está constituido por 4 tejidos, dos tejidos blandos: encía y ligamento periodontal y dos tejidos mineralizados: hueso alveolar y cemento radicular.



Encía

Es la porción de la mucosa oral que recubre el hueso alveolar y la porción cervical del diente, se compone de una capa de tejido epitelial y un tejido conectivo subyacente llamado lámina propia, la capa epitelial se divide en tres compartimentos: gingival, del surco y epitelio de unión. El tejido conectivo a su vez se divide en compartimentos superficiales y profundos.¹

El epitelio gingival es una barrera física contra los microorganismos, la cual muestra variaciones morfológicas de acuerdo a su ubicación.² Se ha dividido en encía marginal, interdental y adherida o insertada. Es el único tejido periodontal

visible clínicamente en una cavidad bucal sana por lo tanto es el indicador más temprano de salud-enfermedad del periodonto, se caracteriza por presentar color rosa coral, la encía libre marginal normalmente mide 1.5 mm aproximadamente en sentido corono apical, rodea a cada diente, es delimitada apicalmente por la línea mucogingival que la separa de la mucosa oral, la superficie de la encía presenta un puntilleo con apariencia de cáscara de naranja.³ La importancia de la encía para el periodonto recae en su papel de resistir las agresiones producidas por bacterias, químicos y traumas a los que la cavidad oral está sujeta a diario.⁴

La composición química de la encía incluye proteínas colágenas, no colágenas, glucosaminoglucanos y proteoglicanos. La colágena comprende las tres quintas partes del total de proteínas, la colágena tipo I es la más abundante. Las colágenas tipo I, III y V tienen una composición bioquímica diferente a las encontradas en otras partes del cuerpo como en la piel, dicha diferencia, se ha sugerido que radica en presentar diferentes sitios de escisión en los grupos amino y carboxilo terminal de peptidasas procolágeno.⁵

Existen también en la composición de la encía un grupo heterogéneo de proteínas no colágenas. Se han identificado proteínas con un peso aproximado de 15 a 75 kDa, así como el sistema de fibras elásticas en parte responsable de las propiedades elásticas de la encía y moléculas de adhesión en la matriz extracelular como la fibronectina.⁵

La encía es un tejido con actividad metabólica muy alta, en continua remodelación de su tejido conectivo en respuesta a factores locales y ambientales, cambiando su composición proteica en respuesta a éstos.³

La Composición bioquímica del tejido conectivo gingival está constituida por Colágenas: Tipo I (mayor abundancia), Tipo III, Tipo IV, Tipo V y Tipo VI. Proteínas no colágenas: Laminina, Fibronectina, Osteonectina, Tenascina, Sistema de Fibras elásticas. Glucosaminoglucanos: Dermátán sulfato (60%), Condroitín 4 sulfato (28%), Heparán sulfato y Ácido hialurónico. Proteoglicanos: Decorina y Versicano.⁵

Ligamento periodontal.

Es un tejido conectivo especializado, vascularizado el cual le brinda sostén y nutrición al órgano dentario; es considerado un sistema de amortiguación pues resiste y distribuye las fuerzas de masticación, además contribuye a la reparación de daño tisular proporcionando homeostasis. Mide aproximadamente 0.15 y 0.38 mm de ancho. Desde su formación, derivado de la capa interna del folículo dental, el tejido conectivo desorganizado es remodelado y su matriz extracelular temporal es convertida en un sistema de fibras organizadas. El tejido reorganizado ahora puede establecer un continuidad en todo el espacio del ligamento y de este modo asegurar la unión del diente al hueso.^{4,6} En dirección coronal, el ligamento periodontal se continua con la lámina propia de la encía. Está delimitado por las fibras que conectan la cresta del hueso alveolar con el cemento radicular denominándolas fibras de Sharpey, compuestas de colágena tipo I y III y en menor proporción colágena tipo V, XII y VI.

Las fibras de colágena han sido divididas por su localización y estructura. Existen las fibras de la cresta alveolar, fibras horizontales, fibras oblicuas y fibras apicales. La organización fibrilar y suprafibrilar del ligamento periodontal es regulada por proteoglicanos como decorina, versicano y biglicanos, y por las principales proteínas de matriz extracelular como fibronectina, fibromodulina, lumican.^{1,7,8} El ligamento periodontal tiene características asociadas a sus densas fibras para resistir y absorber el estrés mecánico durante la actividad fisiológica normal, sin embargo actualmente se ha demostrado la presencia de marcadores tendo-específicos como Scleraxis y Tem (tenomodulina), el cual se cree que desempeña un papel regulador durante el desarrollo y la regeneración del ligamento periodontal.^{9,10}

El ligamento periodontal contiene numerosas células diferenciadas y sus precursores. Las células diferenciadas incluyen células sintéticas como cementoblastos, fibroblastos y osteoblastos; células de reabsorción como osteoclastos y fibroblastos que se caracterizan por el rápido recambio de la matriz extracelular, así como el continuo remodelamiento de los haces de fibras de

colágena; ^{4,5} células epiteliales o restos de Malassez que son remanentes de la vaina epitelial de Hertwing localizados en el ligamento periodontal cerca del cemento radicular, su función no ha sido bien establecida pero podrían estar involucradas en los procesos de reparación y regeneración periodontal; monocitos y macrófagos.^{4,11}

Las células troncales mesenquimales indiferenciadas, tienen un papel fundamental en la homeostasis y la reparación de heridas del periodonto debido a que no solo reparan el ligamento periodontal sino que además restauran hueso alveolar y cemento, estas células están localizadas perivascularmente en el ligamento periodontal y adyacentes a espacios endosteales del hueso alveolar, las células derivadas de las troncales maduran durante su migración hacia las superficies del cemento o hueso alveolar.^{4,11,12,13}

Composición bioquímica del ligamento periodontal⁴	
Colágenas	I, II, III, IV, V, VI y XII.
Proteínas no colágenas	Fosfatasa alcalina, fibronectina, laminina, osteonectina, Tenascina, Undulina, Sistema de fibras elásticas.
Glucosaminoglucanos	Heparán sulfato, Dermatán sulfato, Condroitín sulfato, Condroitín 4 sulfato y ácido hialurónico.

Hueso alveolar

El proceso alveolar es la porción del maxilar y mandíbula que forma y sostiene los alvéolos dentarios. Se forma cuando el diente erupciona a fin de promover la inserción ósea para el ligamento periodontal. Desaparece de manera gradual una vez que se pierde el diente. El proceso alveolar consiste en una tabla externa de hueso cortical y laminilla óseas compactas. Una pared interna del alveolo, constituida por hueso compacto delgado llamado hueso alveolar. Trabéculas esponjosas operan como hueso alveolar de soporte.²

Es posible dividirlo en zonas anatómicas distintas sin embargo funciona como unidad con todas las partes interrelacionadas en el soporte de la dentición. La mayor parte de las porciones vestibulares y linguales de los alveolos está

constituida por hueso compacto solo. El esponjoso rodea la cortical alveolar en la zonas apical, apicolingual e interradicular.²

En relación a su composición, está constituido orgánicamente por colágenas tipo I y III, contiene además proteínas no colágenas como osteocalcina y sialoproteína ósea, así como componentes no específicos como osteopontina, osteonectina y proteínas morfogenéticas de hueso (BMP's)^{13,14}

Presenta una fase mineral que representa el 50% de la composición total, esta se encuentra constituida principalmente por calcio y fosfato en forma de cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).⁷

Cemento radicular

Fue descrito por primera vez en 1835. Es un tejido conectivo especializado mineralizado que cubre la superficie radicular de los órganos dentarios desde la unión cemento-esmalte, se encuentra en el a nivel cervical del órgano dentario, en la unión de la corona y la raíz dental hasta el ápice. El cemento tiene un grosor de 50-200 μm , que recubre por completo las superficies radiculares y forma la interface entre la dentina radicular y el ligamento periodontal. Es un componente del diente pero funcionalmente pertenece al periodonto.^{3,13} En él se insertan las fibras de Sharpey permitiendo su unión al hueso alveolar. También tiene funciones adaptativas y reparativas jugando un papel crucial para mantener la relación oclusal y proteger la integridad de la superficie radicular y de los túbulos dentinarios subyacentes así como el sellado de pulpas necróticas mediante oclusión apical.^{3,5} Comparte algunas características histológicas con el hueso alveolar y la dentina, sin embargo cuenta con características únicas como avascularidad directa, carecer de inervación propia y drenaje linfático, recambio metabólico bajo y no sufre procesos de remodelación pero presenta procesos de aposición constante.^{7,15,16}

Cementogénesis.

Basados en la observación fenotípica de cementoblastos, y tomando en cuenta que no es claramente conocido el origen del cemento, algunos autores sugieren que el cemento celular y acelular tienen un origen embriológico distinto. Estudios sugieren que las células progenitoras de cementoblastos provienen del folículo dental, las cuales tienen un origen ectomesenquimatoso. Sin embargo actualmente se considera que los cementoblastos pueden tener un origen epitelial, derivando de la vaina epitelial de Hertwig y que posteriormente ocurre un mecanismo de diferenciación epitelio-mesénquima. ^{17,18}

El mecanismo en cementogénesis inicia con el depósito de matriz sobre la superficie dentinaria por células de la vaina epitelial de Hertwig, las cuales se desorganizan, posteriormente las células ectomesenquimales del folículo dental migran, se organizan y se diferencian en cementoblastos que secretan matriz cementaria. ^{17,19,20}

La cementogénesis tiene dos fases, la prefuncional que ocurre durante la formación de la raíz en etapas pre-eruptivas y la funcional que se da cuando el diente está en oclusión y el cemento celular está formado. La fase funcional ocurre durante toda la vida y está relacionada con procesos adaptativos y reparativos que dan origen a distintos tipos de cementos.

Durante la formación de la raíz, el epitelio interno y el epitelio externo del esmalte se unen a nivel cervical para formar la vaina epitelial radicular de Hertwig (HERS), la cual prolifera y migra apicalmente a través del tejido ectomesenquimatoso dividiéndolo en papila dental y folículo dental. ^{21,22,23}

El epitelio interno del órgano del esmalte de la vaina epitelial de Hertwig induce a las células adyacentes de la papila a diferenciarse hacia odontoblastos que producirán predentina,¹⁸ posteriormente se desintegraran a nivel cervical y las células de origen mesenquimatoso inducidas por la vaina epitelial de Hertwig se diferencian a precementoblastos, mismos que una vez diferenciados a cementoblastos secretaran matriz cementoide. ^{24 25 26,27,29}

Una vez que las células de la vaina epitelial de Hertwig fenestran, algunas de ellas se alejan de la raíz en dirección apical hacia la futura zona del ligamento periodontal donde se reorganizan y forman los restos epiteliales de Malassez, algunas células que permanecen en la superficie regulan la cantidad de cemento acelular depositado.^{22,28,18} Durante la segunda fase de la cementogénesis, la proliferación de la vaina epitelial de Hertwig se reduce y algunas células quedan atrapadas en la capa de cemento en formación^{23,28}

La teoría sobre el origen epitelial de los cementoblastos, establece que, una vez formada la dentina radicular, la vaina epitelial de Hertwig sufre una transformación ectomesenquimal para diferenciarse en fibroblastos y cementoblastos que secretan cemento acelular y celular respectivamente.^{23,29,30,31}

Es controversial el origen del cemento, mientras algunos autores sustentan el origen epitelial en presencia de la vaina epitelial de Hertwig, algunos otros lo hacen en ausencia de la misma, esto ha permitido sugerir la transformación epitelio-mesénquima de la vaina epitelial de Hertwig hacia cementoblastos.^{28,30,32,33} Sin embargo existen estructuras distintivas que condicionan el origen epitelial como lo son los tonofilamentos rudimentarios y desmosomas en células parecidas a los cementoblastos y por consiguiente, las células que carecen de rasgos epiteliales como los cementoblastos, pero que se encuentran entre células con características epiteliales podrían haber completado la transformación epitelio-mesénquima. Dado que durante etapa inicial de cementogénesis no todas las células de la vaina epitelial de Hertwig migran, alejándose de la raíz, este hecho sustenta el origen epitelial de los cementoblastos.^{33,34}

Tipos de cemento

1. Cemento acelular de fibras extrínsecas (AIFC), es encontrado en la parte media y coronal de la raíz del diente cubriendo del 40 al 70% de esta y contiene a las fibras de Sharpey. Este tipo de cemento es parte importante del aparato de unión y conecta al órgano dentario con el hueso alveolar y tiene un constante

crecimiento. Contiene fibras en su matriz que incrementan en longitud y densidad en dirección apico-coronal. Dentro de sus roles principales tiene el potencial de adaptarse a las alteraciones funcionales como los desvíos mesiales dentales.^{15,19}

2. Cemento celular de fibras intrínsecas (CIFC), contiene cementocitos embebidos en una matriz de colágena de fibras intrínsecas. Estas fibras colágenas están orientadas la mayoría paralelamente a la superficie de la raíz. Una deposición rápida de la matriz por los cementoblastos, la cual ocurre entre la desviación de la vaina epitelial de Hertwig y la superficie dentinaria parece ser la razón de la incorporación de algunos cementoblastos en su matriz. Se localiza en el tercio apical, en bifurcaciones, en sitios de fractura, juega un papel importante en el proceso de reparación.^{19,35,36}

3. Cemento acelular afibrilar (AAC), el área y localización varía de diente a diente, se deposita a nivel de la unión amelo-cementaria, su principal componente son glucosaminoglucanos.

4. Cemento celular, mixto estratificado (CMFC), estrictamente encontrado en humanos, en las bifurcaciones y en el tercio apical de las raíces; está constituido por capas alternadas de cemento acelular con fibras extrínsecas e intrínsecas conocidas como líneas incrementales.^{15,19}

Composición del cemento.

La composición química del cemento es muy similar al hueso, alrededor del 50% es matriz inorgánica, conformada por fosfatos de calcio organizados en forma de cristales de hidroxiapatita y el otro 50% los constituye la matriz orgánica.

La matriz orgánica del cemento está compuesta principalmente por colágenas tipo I (90%) y tipo III (5%),^{3,21} así como proteínas no colágenas, dentro de las cuales encontramos a sialoproteína ósea (BSP) la cual es probable que tenga funciones de adhesión de células a la superficie radicular y participa en eventos tempranos de mineralización, además de ser considerada como quimiotáctica para precementoblastos y es promotora de diferenciación. Otra proteína no colágena es

osteopontina (OPN), la cual se expresa durante periodos de actividad cementogénica, y se le confieren propiedades para regular migración y diferenciación celular al interactuar con integrinas.³⁷ Tanto BSP como OPN tienen propiedades de adhesión celular por su secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) y se piensa que tienen un rol importante en la diferenciación de células progenitoras de cementoblastos. La fibronectina une células a la matriz extracelular. La tenascina está presente en la vaina epitelial de Hertwig durante la diferenciación de odontoblastos y posteriormente en el sitio de anclaje del ligamento periodontal a la superficie radicular. La fosfatasa alcalina participa en la mineralización del cemento. Osteonectina, osteocalcina y laminina también se encuentran en cemento así como proteoglicanos como condroitín sulfato, dermatán sulfato y ácido hialurónico.^{5,19,4}

Contiene además diversos factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF α y β), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I); así como proteínas morfogénicas óseas BMP-2, 3 y 4.³⁷

El cemento contiene moléculas específicas como el factor de crecimiento del cemento (CGF)⁵, una isoforma del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1),⁴ la proteína de adhesión al cemento (CAP)³⁸ y la proteína del cemento 1 (CEMP1).^{39,40}

Proteína del cemento 1 (CEMP1)

Es una proteína con un peso molecular teórico de 25.9 kDa, sin embargo se ha sugerido que, debido a que las modificaciones postraduccionales, el peso molecular aumenta en 43.5% el peso total de la proteína nativa, por lo que la movilidad relativa (M_r) es de 50,000.^{42,43} Está constituida por 247 aminoácidos, fue aislada a partir de una biblioteca derivada de cementoblastos putativos humanos cultivados *in vitro*. Se expresa en cementoblastos putativos, en

subpoblaciones de células derivadas del ligamento periodontal con localización paravasculares, cementoblastos y células de los espacios endosteales.

Ensayos *in silico* sugieren que el ADNc está constituido por 1374 nucleótidos con una ORF (marco abierto de lectura) de 744 y presenta, de acuerdo a las bases de datos, 100% de homología con una clona de ADN de *Homo sapiens* presente en el cromosoma 16 (Gene Bank AC093525.3).

Espacialmente, se sugiere que CEMP1 está localizada en el núcleo sin embargo no presenta estructuralmente motivos de unión a ADN. A pesar de no presentar homología con alguna otra proteína, de acuerdo a la búsqueda en base de datos, presenta una región parecida a colágena tipo X en un 40 %, a nivel de los residuos del 30 al 110 y presenta reacción cruzada con anticuerpos específicos contra la misma, sin embargo carece de repeticiones Gly-x-y, clásicas de colágena X.^{40,41,42.}

Su caracterización ha sido hasta la fecha de forma parcial. En relación a su estructura secundaria, se sugiere de acuerdo a los ensayos de análisis de dicroísmo circular que su estructura secundaria está distribuida de la siguiente manera; hojas β , de las cuales un 32.4% es β -anti paralela, 16.7% corresponden a giros- β y 5.8% a estructura β - paralela; estructura α -hélice en un 10% y conformación al azar en un 35%.⁴² Presenta fosforilaciones en residuos de serina y treonina; además de dos sitios para N-glicosilaciones en los aminoácidos 20 y 25 (Asn-X Ser/Thr).^{42,43}

CEMP1 no se expresa en otros tejidos humanos como cerebro, corazón, pulmón, hígado y aorta por lo que constituye un marcador biológico para cementoblastos y los progenitores putativos en el ligamento periodontal.^{39,41,44} Carmona y colaboradores demostraron que la transfección con el gen de CEMP1 y la sobreexpresión de esta en fibroblastos gingivales humanos (células no mineralizantes) promueve la diferenciación de estas células hacia un fenotipo mineralizante.⁴³

CEMP1 participa en el depósito y composición de los cristales de hidroxiapatita así como en la regulación de la expresión de las proteínas ALP, OPN y BSP en cementoblastos putativos *in vitro*^{40,45} por lo que, es probable que juegue un papel fundamental en la regulación local de la diferenciación de los cementoblastos y en la mineralización de la matriz extracelular del cemento.⁴⁶ Existen estudios que demuestran que células derivadas del folículo dental tratadas con extracto derivado de proteínas de matriz de esmalte reguladas por la fosforilación de Smad1 y por la vía de MAPK, se diferencian a un fenotipo cementoblástico expresando CEMP1 y CAP, sugiriendo una regulación en su proliferación y diferenciación celular.⁴⁷

Proteína de adhesión al cemento (CAP)

PTPL (por sus siglas en inglés) se refiere a la familia de genes identificada como Proteínas Tirocinas parecidas a las Fosfatasas. Uno de los tres miembros de la familia de las PTPL es PTPLA, ésta última presenta una prolina substituyendo a una arginina y esto le confiere inactivación y por lo tanto no presenta actividad fosfatasa y puede representar una clase diferente de PTPasas.⁴⁸

El gen de la proteína de adhesión del cemento se localiza en el cromosoma 10p13-p14, se considera un splicing alternativo del gen PTPLA. La proteína de adhesión del cemento (CAP)^{38,49} ha sido aislada de extractos de cemento maduro, se ha purificado y caracterizado parcialmente;^{50,51} posee 140 aminoácidos y un peso molecular de 14.920 kDa. El splicing alternativo de la proteína CAP/PTPLA ocurre en sus 15 últimos aminoácidos, este evento ocurre en el sitio activo (LLEIVHCLIGIVPTS) de la isoforma 1 constituida por 288 aminoácidos del gen de PTPLA. Los últimos quince aminoácidos de CAP/PTPLA corresponden a VSFPSCCFSIAVIFM y son específicos para esta proteína. Los análisis *in silico* de CAP/PTPLA indican que su carga eléctrica es neutra (pI 7.78) debido al número similar de aminoácidos positivos (Arg, Lys) y negativos (Asp, Glu). Se sugiere que es una proteína hidrofóbica por la presencia Arg, Lys, Asp y Glu en las zonas 70-98 y 118-137; y que su localización es citoplasmática en un 94.19% debido a la carencia de péptido señal.⁵²

También, estos análisis sugieren la existencia de modificaciones postraduccionales, particularmente, fosforilaciones en serinas 12, 30, 33, 43, 53; y en treoninas 5, 103. Finalmente, la estructura secundaria de la proteína presenta α -hélices en los aminoácidos 5-15, 39-42, 58-102, 115-126 y 133-139, y conformaciones β en las posiciones 15-37, 43-64, 102-115 y 128-132.⁵²

Es una proteína con una movilidad relativa de 54-57 kDa, con una secuencia de aminoácidos que presenta cierta homología con la colágena tipo I y XII, sin embargo no se ha encontrado reacción cruzada entre CAP y estas colágenas.⁵⁰ Se ha aislado, caracterizado y purificado a partir de extractos de cemento maduro bovino y humano.^{51,53} Anticuerpos monoclonales contra CAP de bovino (H166) incubados con tejidos humanos reconocen cemento (AEFC, CIFC) y matriz cementoide, pero no se expresa en dentina, gíngiva, o ligamento periodontal. El hueso alveolar tampoco fue reconocido por los anticuerpos, excepto por algunas células paravasculares.³⁸ El anticuerpo monoclonales contra CAP bovina (3G9) reconoció cementoblastos y cemento en cortes de adulto y en gérmenes dentarios de bovino.⁴⁹ Mientras que en células del folículo dental transplantadas en ratón, 3G9 reconoce un tejido parecido al cemento.⁵⁴ 3G9 se considera un anticuerpo específico contra CAP, por que no detecta ningún tipo de colágena.⁴⁹ CAP también ha sido identificada en células derivadas de tumores humanos (las cuales la sintetizan, la expresan en su superficie y la secretan)^{53,55} y en células del ligamento periodontal.⁵⁶

Se ha inmunolocalizado en la matriz del cemento radicular, en espacios endosteales del hueso alveolar y en zonas paravasculares del ligamento periodontal; así como en cementoblastos putativos *in vitro* e *in vivo*.^{39,38,49,50}

CAP ha mostrado promover varias actividades biológicas como la adhesión celular sugiriendo que este evento suceda a través de una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) y del receptor de integrina $\alpha 5\beta 1$ localizado en la superficie de las células,^{57,58} quimiotaxis selectiva en células periodontales,^{59,60} diferenciación,⁶¹ así como la expresión de fosfatasa alcalina y promueve *in vitro* la formación de un tejido mineralizado parecido al cemento.^{39,40,51,53,62,63} CAP (de bovino) se une

específicamente a dentina mineralizada, a hidroxiapatita, a fibronectina y al complejo fibronectina-colágena, pero no a la dentina desmineralizada.⁶⁴

Fosfatasa alcalina (ALP)

Es una proteína glicosilada con actividad enzimática que se localiza en la porción externa de la membrana citoplasmática y en las vesículas de matriz, las cuales contribuyen a la mineralización de la matriz extracelular formando fosfatos de calcio amorfos y cristales de hidroxiapatita.⁶⁵ Se cree que participa en el proceso de mineralización del cemento mediante la precipitación de sales de fosfato de calcio. Su actividad aumenta al iniciar el proceso de mineralización de la matriz extracelular, por lo que es un marcador temprano de biomineralización.⁶⁶ Su actividad se ha localizado en placas de crecimiento de cartílago, en células endosteales, células de medula ósea, osteoblastos y cementoblastos. En hueso, se ha identificado en el frente de mineralización.⁶⁷ En molares de rata se ha descrito su distribución heterogénea en el ligamento periodontal, con una mayor actividad en las porciones adyacentes al hueso alveolar y el cemento. Su actividad es mayor adyacente al cemento celular de fibras intrínsecas en comparación del cemento acelular de fibras extrínsecas.⁶⁸

Sialoproteína ósea (BSP)

Es una glicoproteína fosforilada y sulfatada, encontrada principalmente en hueso de 59-kDa, se une estrechamente a la matriz de colágena e hidroxiapatita, participa en el proceso de mineralización y tiene propiedades de adhesión celular debido a sus secuencias de Arg-Gly-Asp (RGD) de unión a integrinas. El cemento acelular afibrilar y el cemento acelular de fibras extrínsecas parecen contener una mayor cantidad de esta proteína.⁶⁹ Se expresa en células a lo largo de la superficie radicular durante el desarrollo de la raíz y también en dientes maduros. El papel más destacado que se le atribuye es como nucleador de cristales de hidroxiapatita, por lo que desempeña un papel importante en las etapas iniciales de la mineralización y se le considera como un marcador de diferenciación de

osteoblastos y cementoblastos. Es quimiotáctica para pre-cementoblastos y promueve su adhesión y diferenciación.^{70,71}

Amelogenina (AMEL)

Las amelogeninas son las proteínas del esmalte más abundantes (90%) de todas las secretadas por los ameloblastos. Es hidrofóbica, rica en prolina, glutamina, leucina e histidina, muy conservada evolutivamente entre diferentes especies lo que sugiere un papel crucial en la formación del esmalte y procesos de biomineralización.^{75,77,78} En la matriz extracelular del esmalte están presentes múltiples amelogeninas presentes, producto de splicings alternativos del gen.

La amelogenina contiene dominios altamente hidrofóbicos e hidrofílicos, y es esa naturaleza bipolar la que le permite a los monómeros de amelogenina el auto-ensamblaje que resulta en la formación de nano-esferas, lo que se asume es crítico para la función de esta proteína estructural durante la formación del esmalte, estabilizando los recién formados cristales de hidroxiapatita y posteriormente influenciando su crecimiento en tamaño.^{72,78,79,80,81}

El gen de la amelogenina está localizado en los cromosomas sexuales X y Y, y es el polimorfismo entre AMGX y AMGY lo que permite el uso del gen de la amelogenina para determinar el sexo en muestras de DNA en ciencias forenses. Basados en experimentos de pérdida de función y observaciones a pacientes con amelogénesis imperfecta, se cree que las funciones de la amelogenina son regular la orientación, forma y longitud de los cristales de hidroxiapatita en el esmalte.

Ameloblastina (AMBN)

También conocida como amelina, representa el 5% de las proteínas no amelogeninas del esmalte, es una proteína aniónica, rica en prolina, glicina y

leucina, tiene un dominio DGEA identificado como para integrinas $\alpha 2\beta 1$, y dominio de adhesión celular parecido a trombospondina.

Es localizada en el cromosoma humano 4q21, esta proteína está presente en la etapa secretora de la formación del esmalte y es sintetizada como una proteína de 65-70 kDa que rápidamente es procesada hacia numerosas proteínas de bajo peso molecular de 52 a 13 kDa. Es localizada en los procesos de Tomes de los ameloblastos secretores y en el espacio de la vaina y el esmalte, lo que sugiere un rol en la biomineralización del esmalte por esta proteína. También es detectada en células mesenquimales de la pulpa, pre-odontoblastos, odontoblastos y en la vaina epitelial de Hertwig.⁷⁹

Biomineralización.

Los mecanismos que regulan el proceso de biomineralización son sistemáticos y están orquestados por diferentes moléculas en diversos sistemas biológicos en donde la formación y organización de los precursores de hidroxiapatita está altamente regulada. En los vertebrados, los cristales de hidroxiapatita constituyen la fase mineral, la cual se deposita en la matriz orgánica.^{82,83}

Para que ocurra la nucleación de los cristales de hidroxiapatita es necesario que haya una fuente de iones de calcio y fosfatos, y la participación de una o varias biomoléculas.^{84, 85, 86}

En el caso del hueso y dentina, se ha observado que los osteoblastos y odontoblastos, liberan vesículas que mantienen la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, presente en la membrana celular, la cual libera los iones fosfato. Además, proteínas transmembrana, las llamadas anexinas, forman canales de calcio que permiten la entrada de dichos iones. Posteriormente, las células forman uniones intercelulares rodeando la matriz en formación, separándola del medio circundante. Con el establecimiento de uniones intercelulares, las células secretan proteínas no colágenas con propiedades acídicas con alta afinidad por calcio. La matriz constituida principalmente por colágena tipo I y proteoglicanos sulfatados,

sirve como andamio para la asociación de proteínas no colágenas. Permitiendo, de esta manera la orientación del crecimiento cristalino.^{83, 84, 86, 87}

Se han realizado varios estudios con diversos sistemas experimentales, libres de células, para determinar el efecto de proteínas de tejidos mineralizados en la formación de hidroxapatita *in vitro*. Los sistemas a base de la difusión en gel son comúnmente empleados para evaluar la capacidad nucleadora de cristales usando diversas biomoléculas, debido a que simulan a las características de la matriz de los tejidos mineralizados además que se tiene un mejor control de la concentración y la naturaleza de los componentes del gel, difusión de los iones, y en condiciones similares a las fisiológicas (pH, temperatura y presión) que pueden influir en la formación y crecimiento del gel.^{88,85}

ARN DE INTERFERENCIA

El silenciamiento génico es un proceso sumamente importante en la mayoría de los organismos.

El ARN de interferencia se ha convertido en un método eficaz para silenciar genes específicos.⁸⁹ El silenciamiento por ARN es un mecanismo altamente conservado por la naturaleza, en que moléculas de ARN de doble cadena (dsRNA) regulan la expresión de genes. Este fenómeno fue inicialmente descubierto en 1990, cuando botánicos que se encontraban trabajando con petunias intentaron sobre expresar la enzima que produce el color púrpura. Para ello introdujeron varias copias del gen que codifica para esta enzima esperando encontrar que las plantas que sobre-expresaran la enzima fueran púrpuras, sin embargo se encontraron que se generaban flores sin color o con parches blancos, esto implicaba que los genes que introdujeron en las plantas no se estaban expresando, pero también el gen natural de la planta dejaba de expresarse, por esta razón el fenómeno se llamo co-supresión. Dos años después en un hongo llamado *Neurospora crassa* un fenómeno equivalente fue descrito, al que llamaron quelling (detener abruptamente). En 1998, estas observaciones se comprendieron mejor tras las investigaciones de Andrew Fire y Craig Mello que descubrieron que tras la

inyección de dsRNA dentro del nemátodo *Caenorhabditis elegans* se producía un silenciamiento de la expresión de genes que era específico de esa secuencia, es decir, que la expresión del gen que presenta la misma secuencia que el dsRNA se inhibía. Este fenómeno explicaba la co-supresión como el quelling y fue denominado interferencia de ARN (RNAi).⁹⁰ Tom Tuschl describió que cuando se utilizan directamente los siARN, es posible inducir un proceso de interferencia en células de mamíferos sin que despierte la respuesta que conduce a la muerte celular, esto abrió la posibilidad de utilizar la interferencia del ARN como una herramienta en la investigación en células de mamíferos.⁹¹

Aunque el silenciamiento génico presenta diferencias en animales frente a hongos y plantas, los procesos moleculares son básicamente los mismos. La vía normal de silenciamiento inicia 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 cualquiera de los casos, estas cadenas dobles de ARN son cortadas en pequeños fragmentos (19 a 24 nucleótidos) de doble cadena con extremos 3'salientes (2-3 nucleótidos) denominados siRNAs (short interfering RNA) lo anterior es realizado por una enzima denominada Dicer. La caracterización de Dicer permitió identificarla como una RNAsa tipo 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 separando las dos cadenas dejando sólo una cadena, la antisentido asociada al complejo. El complejo ribonucleoproteico resultante se une al mRNA diana en donde puede inducir su degradación o puede inhibir la traducción.

Tipos de ARN de interferencia.

Se han descrito varias clases de moléculas pequeñas de ARN que desencadenan el proceso de silenciamiento por interferencia, la más ampliamente utilizada son los ARN interferentes pequeños (siRNA) y los microARN (miRNA).⁹²

Los siRNA tienen un tamaño de 21 a 25 nucleótidos y son producidos a partir de

precursores de RNAs de doble cadena que pueden variar de tamaño y origen, estos precursores son procesados por miembros de la familia de enzimas que degradan RNA, conocida como RNAsa tipo III. La enzima que degrada los precursores de dsRNA hasta siRNA se conoce como Dicer.⁸⁹

Los siRNA resultantes son incorporados a un complejo denominado siRISC (RNA-induced silencing complex), esta incorporación está acoplada a la separación de las dos cadenas sencillas, sólo una de las cuáles, conocida como cadena guía se mantiene asociada al complejo y sirve para identificar el ARNm con la secuencia complementaria. Cuando las moléculas de ARNm complementarias son encontradas, la interacción entre el siRNA y este ARNm desemboca en el corte del ARNm y su posterior degradación.⁹² Si la complementariedad no es perfecta, RISC queda asociado al mensajero y se inhibe la traducción.

Existen también dos complejos multiproteicos uno formado por ARN-helicinas, proteínas asociadas a ARN y otras ribonucleoproteínas, y otro complejo denominado microprocesador al que pertenecen las proteínas Drosha (RNAsa tipo III) y Pasha. El complejo microprocesador situado en el núcleo celular reconoce y corta los transcritos primarios denominados miRNA primitivo que puede tener una longitud comprendida entre varios cientos y varios miles de bases. Así se generan los miRNA (micro-RNA) cadenas de horquillas de 70 nucleótidos que serán procesados por Dicer, como se ha descrito anteriormente.

El mecanismo de interferencia está presente en todos los eucariontes en los que se ha buscado esto sugiere que es un mecanismo muy antiguo que apareció temprano en la evolución y que tiene un papel importante en el mantenimiento del funcionamiento celular.⁹³ La interferencia de ARN ha demostrado ser una herramienta muy eficiente para reducir la expresión de un gen. Hay 2 tipos de estrategias para la utilización de la interferencia de ARN, los transitorios donde la expresión del gen se interfiere temporalmente y los estables donde las células o el organismo están permanentemente interferido. La anulación de la función se puede hacer de varias maneras, una de ellas es mediante la utilización de ARN de interferencia para el gen de la proteína de interés, esto deberá ocasionar la pérdida de la función de la proteína.

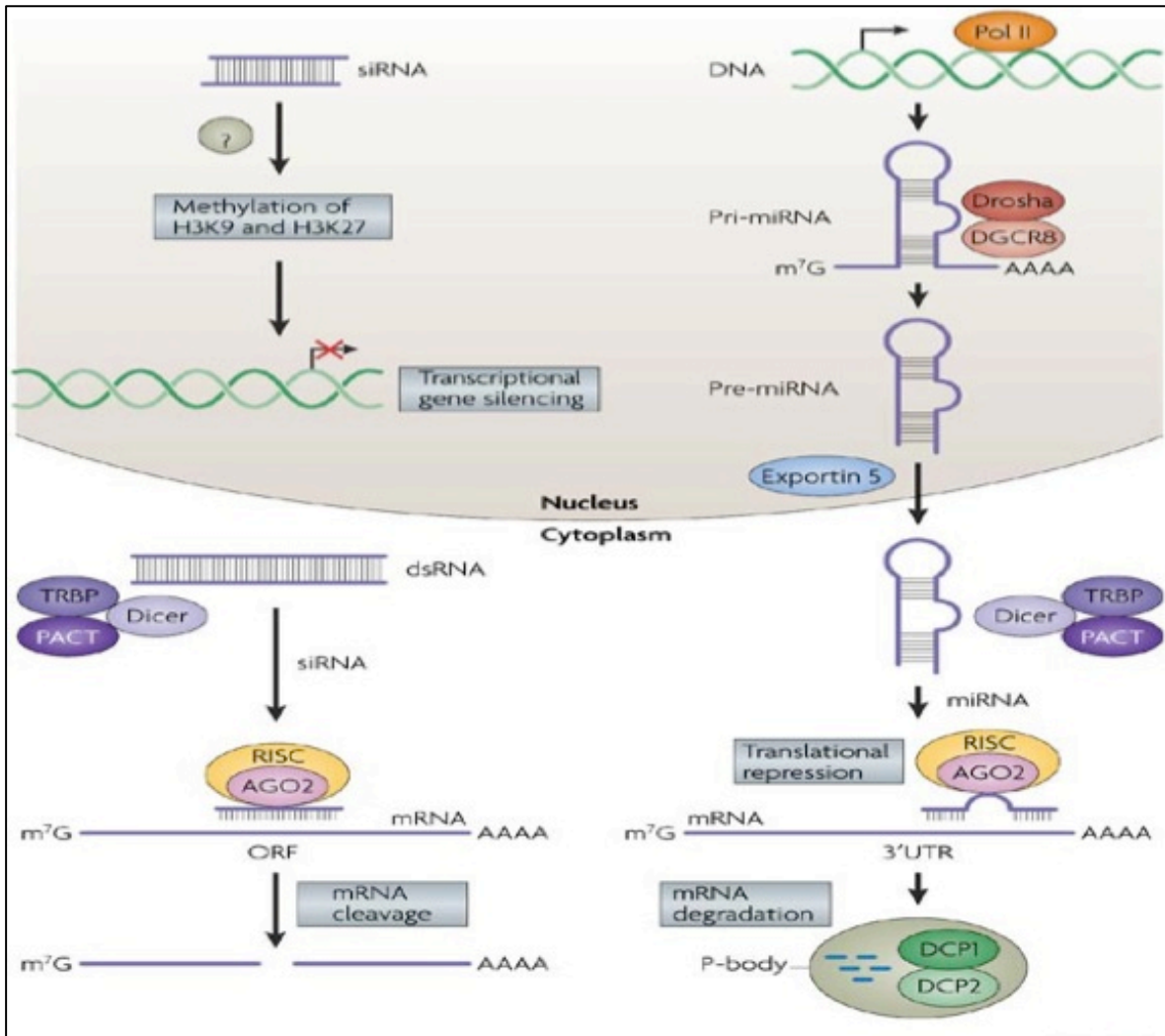


Figura 1. Mecanismos de interferencia por ARN. Tomado de Daniel H. Kim & John J. Rossi. Strategies for silencing human disease using RNA interference. Nature Reviews Genetics 2007; 8:173-184.

PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cemento es un tejido clave para la inserción de las fibras del ligamento periodontal en las superficies radiculares, contiene factores relevantes en la formación y regeneración de tejidos periodontales. La existencia de marcadores específicos en el cemento como CAP y CEMP-1, sirven como punto de partida para entender el proceso de mineralización, sin embargo aún falta verificar si entre estas proteínas existe un factor sinérgico que permita dilucidar el mecanismo de mineralización y su impacto en el resto de las proteínas no colágenas que también participan en la regulación y dirección de este proceso. Las alternativas experimentales como el silenciamiento en la expresión génica contribuirán al mejor entendimiento de la cementogénesis.

HIPÓTESIS

CEMP-1 y CAP son proteínas específicas de cemento involucradas en el proceso de mineralización por lo cual al silenciar el gen que regula la expresión de dichas proteínas, el proceso de mineralización se verá alterado.

OBJETIVO GENERAL

Reconocer los efectos en la expresión génica y traduccional en el proceso de mineralización utilizando ARNi de CAP, CEMP-1 y CAP/CEMP-1.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Reconocer el efecto del silenciamiento por ARNi de CAP en el proceso de mineralización a nivel transcripcional y traduccional.
- Reconocer el efecto del silenciamiento por ARNi de CEMP-1 en el proceso de mineralización a nivel transcripcional y traduccional.
- Reconocer si existe un efecto sinérgico en el proceso de mineralización a nivel transcripcional y traduccional que involucre a CAP y CEMP-1, mediante el uso de ARNi.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO CELULAR

Los cementoblastos se cultivaron y mantuvieron hasta su confluencia en cajas de cultivo de 75 cm² en medio DMEM, suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% y antibióticos (100 µg/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina, Sigma Chemical CO, Saint Louis MO). Las células fueron incubadas en un ambiente 100% de humedad a 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂. Para los experimentos se utilizó medio DMEM, suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% y 5-10µg de Blastidina.

CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN DEL ARNi PARA CAP Y CEMP1.

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:

1. Generación de oligos de doble cadena para CAP y CEMP-1.

Se diseñaron oligonucleótidos de DNA de cadena sencilla complementarios entre sí, siguiendo el protocolo de BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits. Cada uno de ellos constaba de una cadena codificante (cadena superior) para el pre-miRNA blanco y una cadena complementaria (cadena inferior).

- ADNc de PTPLA/CAP

- Secuencia 5´a 3´cadena superior (10)

- TGC TGT AGA AGG TGA GCC AGG CGG TGG TTT TGG CCA CTG
ACT GAC CAC CGC CTC TCA CCT TCT A

- Secuencia 3´a 5´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

- ADNc de CEMP1
 - Secuencia 5´a 3´cadena superior (10)
TGC TGT GCA AAG CCC AGT TAA GGA AAG TTT TGG CCA CTG
ACT GAC TTT CCT TAT GGG CTT TGC A
 - Secuencia 3´a 5´cadena inferior (11)
CCT GTG CAA AGC CCA TAA GGA AAG TCA GTC AGT GGC CAA
AAC TTT CCT TAA CTG GGC TTT GCA C

Se llevó a cabo el alineamiento de los oligonucleótidos de cadena sencilla para generar oligonucleótidos de doble cadena siguiendo el protocolo BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits utilizando los siguientes reactivos: 5µl de oligos de DNA top strand (200µM); 5µl de oligos de DNA bottom strand (200µM); 2µl de buffer de alineamiento de oligos 10X; 8µl de agua libre de DNAsas/RNAsas para un volumen total de 20µl. Se montó la reacción de alineación en tubos de microcentrifuga de 0.5ml a temperatura ambiente y se incubó la reacción por 95°C por 4 minutos. Se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos mezclando suavemente.

2. 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/±EmGFP-miR. Se montó la reacción en el siguiente orden y volumen: 4µl de buffer de ligación 5X; 2µl de pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR linearizados (5ng/µl); 4µl de oligos miR-ds (10nM); 9µl de agua libre de DNAsa/RNAsa; 1µl de ligasa T4 DNA (1U/µl) para un volumen final de 20µl. La reacción se incubó a temperatura ambiente por una hora.

3. Transformación de *E. coli* mediante 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 eran resistentes a

espectomicina por lo que se crecieron en cajas de cultivo que contenían agar y 50µg/ml del antibiótico. Se eligieron dos colonias después de un día de crecimiento y se cultivaron. Se aislaron los plásmidos de DNA. Se secuenció cada pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR para confirmar la presencia y orientación correcta de los oligonucleótidos de doble cadena insertados y para confirmar las secuencias de los mismos. Se tomarón 20µl 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 suavemente. 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 50ng/ml de espectomicina y se incubaron 1 día a 37°C.

CAP

Secuencia completa de nucleótidos que codifican para CAP:

```

gagagctggc tgocgagc coctgcgcg ctgcac atfg ggcgctgac ggaagcggcgccagcgggca gcgctctcg ggctcaggc tggcgagggt
ccccccac gctctgcgctgtctccca cgtccccag gtgcgcgcc acatggcgt ccagcgaca ggaaggccaacggcgcg cctcgaggc
cggcgaggac cgggaggctc ccgcgagcg gagcgctggggctctgg ccaccgctg gctcacctc tacgacatg ccalgaccg
gggggtgtggtctagcta tgcgatgt acgtttat atggaaaag gaacacagc aggttataaaagtacc agaagacact taattttc cagacattg
cctgctgag gtaagtttccatcatgct gttttctat tgcgttaa ttatg gaa cattttgt tglcaaaatcaatgatt ttctgata catacaact alggttgc
tgaigccaa tgtgacagtgttattia atgtttcta ttatgacct aatgatttt tctatttc ttacagatgttcactgitt aatggtag ttttctc aattttac ttattata
aatgcccittaggcaalag ttactgtt ttctttta aggaattgta cctactctg tgaatgactgggtccaa gtgagtcaa gaalcttat gglgtggcic attackcaca
glataaacagtaaglac acaaacatgt tglctactg agccgcagg aaagcttcc atctatagaatcaaaaata ttaacattg tatattcag gagtggagag tgttgacaa
aaaggagtgggttgagt ttatgttg tgcattgact tagtgccta gcagaatgc ttgalacacaacaacaacc aatattggc alctagatc cgtaatat tctcttga
tatttccagtttgaat caglatcag gtlctgaa ataacctgca gaaaatgic ttctatagaatcttt tcaatcaa tglctctc ttgattgta atogaagt
tcaglatacaatttatt tclggcagc cgcagtgcc cacacctgta atcccagcac ttgggagccaaggcgggt ggalcactg aggtcaggag ttgagacca
gctggccaa calggtaaacctgttct actaaaata caaaaataa ccaggctgg ggcgagcac ctggaatccagctactcag gaggcgag cagaagaatc
ggtgaacc gagaggcaa ggttcattgagctgagatt gtccactgc actccagct gggcgacaga gogagactc gtcg

```

Secuencia blanco que codifican para el ARNi de CAP: **ccaccgctg gctcacctc ta**

A. Secuencia de los aminoácidos para los que codifica el ARNi de CAP: **TAWLTFY** (Thr-Ala-Trp-Leu-Thr-Phe-Tyr)

CEMP1

Secuencia completa de nucleótidos que codifican para CEMP1:

```

1 ttactttgt tatgtattt acccaattt ttaaaaaga aaccaaaacc aaccaagat
61 gcttcccaca caactcaaaa tcatctgca gcagctccc ggccagctc tctcacc
121 tgacctggg cccctctccc accaccagg gtaaccctg tggaccaacc atctctgca
181 gccctccc gacctccag ccaggaggt gggcgctg ccggtgaa gggcagcca
241 ggccaaag ctggccagg gctcaccgc tctggactg gcgtcccgc tgggtggg
301 atgaacca tgcagctct gggtttagc tgaag ggc cacatcaagc actgacagcc
361 agcaactgg gcacaggca tgcacaact ctaacatc ggctgagac ctacactgcc
421 tctccctgc tgggacct ggcaagac cctctccc agcccaaga caggcagcg
481 ctggacagc actctcag ggtgcgcg ccgcaagg agagtggtt atctctgac
541 ctcaacetc taaggagtc aggatcaca tccgtgctt gtttctgg gctccctg
601 ggccttgg gctgagata acccttgg cctgcccga gccctctcc caggcaggg
661 cctgccagg caggtggtc tccctgct gttcctcc aacagtggg gccagacca
721 tctatctc ttggacctg agacattcc ttaactggc ttgcaagc agggaagaga
781 acaglgcag agccaggcg gtaactctg tgcacagc agcacctga agcaagggg
841 aaggagcca cccaccagc aactcaagt gagagaagt caagacaat accctgacg
901 tggggctga ccaatcctg acgtctgacc cactgtggc tgcctcaga gccagaggg
961 ctccagaag ccaaccctc cgaactgtt caggagcct caccgcccgt gtttgca
1021 tgggtgtg ccaggccaa ggggacag aagatggc gatgacata atggg g
1081 cagggcac tggctccc cactctccc tccagcca ggcaggctc ccacggcg
1141 caagcaetg gctgggat gttgaaag atagggtat tgaagaga aaacagaacg
1201 ctgtctcc gtggactca ggctagca gtcaggag cagaacaag ggttccggg
1261 cccagctcc ctctggag tcaagcga gccctgca ctgtccctg gccagaacc
1321 aggtgtgg ctccaactg cacaccca ctaggaga gaaagcaac cct

```

Secuencia blanco que codifican para ARNi de CEMP1: **tttcc ttaactgggc ttgca**

B. Secuencia de aminoácidos para los que codifica el ARNi de CEMP1: **FLN WALQ** (Phe-Leu-Asn-Trp-Ala-Leu-Gln)

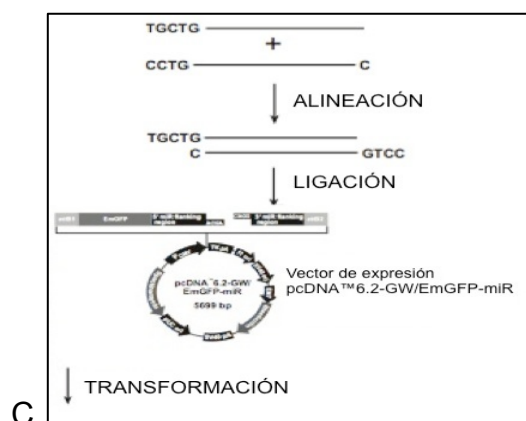


Figura 2. Esquema de la construcción del vector de expresión del ARNi de CAP y CEMP1. A. Secuencia completa y blanco para el ARNi de CAP. B. Secuencia completa y blanco para el ARNi de CEMP1. En ambos casos se presenta los aminoácidos para los que codifica la secuencia blanco. C. Después de tener la secuencia blanco se realizó una reacción de alineación, ligación y transformación.

PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE ARNi-CAP y ARNi-CEMP1.

Se crecieron bacterias de *E.coli* transformadas en 100 ml medio de cultivo LB con espectomicina (50µg/ml) durante 8 hrs en agitación a una temperatura de 37°C. Transcurrido el tiempo, se recolectaron las bacterias por centrifugación a 7500 rpm por 15 minutos a 4°C. Se realizó la purificación del plásmido RNAi de CAP y CEMP-1 de acuerdo al protocolo QIAGEN Plasmid Midi kit. Se resuspendieron y homogenizaron las bacterias en 4ml de buffer P1, se adicionaron 4ml de buffer P2 y se mezclaron vigorosamente por inversión. Se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos, transcurrido este tiempo se agregaron 4ml de buffer P3 se mezcló por inversión y se incubaron en hielo por 15 minutos. Se centrifugó el volumen final obtenido por 30 minutos a 20,000 rpm y se recupero el sobrenadante. Se equilibró la columna QIAGEN-TIP100 agregando 4ml de buffer QBT y se dejó fluir por gravedad, se adicionó el sobrenadante a la columna el cual entró por gravedad. Se lavó la columna con 2X10ml de buffer QC, se eluyó el DNA con 5 ml de buffer QF y se fraccionó. Se precipitó el DNA con isopropanol y se centrifugó a 15,000rpm por 30 minutos a 4°C. Se lavó el DNA con etanol al 70% a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y se dejó secar. Se adicionó agua DEPC y se realizó la cuantificación del plásmido en el Nanodrop.

TRASFECCIÓN ESTABLE DE CEMENTOBLASTOS CON LIPOFECTAMINA Y SELECCIÓN DE CLONAS.

El protocolo para transfección estable de cementoblastos con lipofectamina se realizó como lo indica el protocolo Transient or Stable Transfection of COS7 Cell with Lipofectamine™ Reagent. (Invitrogen, USA). La transfección estable se realizó mediante los siguientes pasos: Se incubaron los cementoblastos a 37°C en una incubadora de CO2 hasta una confluencia del 70 al 80%. Se prepararon las siguientes soluciones en tubos estériles: Solución A: para cada transfección se diluyeron 2µg de DNA (plásmido) en 375µl de DMEM libre de suero con aminoácidos no esenciales. Solución B: para cada transfección se diluyeron 2-15µl

de Lipofectamina en 375µl de DMEM libre de suero con aminoácidos no esenciales. Se combinaron las dos soluciones, mezclando suavemente y se incubaron a temperatura ambiente por 15-45 minutos. Se lavaron las células una vez con 2ml de DMEM libre de suero y con aminoácidos esenciales. Para cada transfección, se adicionó 750µl de DMEM libre de suero a cada tubo que contenía el complejo lípido-DNA.

No se adicionaron antibióticos al medio durante la transfección. Se mezcló suavemente y se vació hasta cubrir las células con la solución de complejo lípido-DNA. Se incubaron las células por 5 horas a 37°C en un ambiente de CO₂. Después de la incubación anterior se adicionaron 1.5 ml de DMEM con 20% de SBF sin quitar la mezcla de la transfección. Se reemplazó el medio en las siguientes 24 horas a partir del principio de la transfección. A las 72 horas a partir del inicio de la transfección se tripsinizaron las células transfectadas y se mantuvieron en medio selectivo con blasticidina (5-10µg). Se estableció una línea celular de cementoblastos transfectada de manera estable que exprese constitutivamente el RNAi de CEMP-1, CAP y CEMP-1/CAP, así como el gen reportero de la proteína verde fluorescente para fines de comprobación del éxito en la metodología.

EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL (qRT-PCR EN TIEMPO REAL).

Se realizó la extracción del RNA utilizando Trizol® Invitrogen de acuerdo a las instrucciones del fabricante. (Invitrogen) Se realizaron ensayos de qRT-PCR de acuerdo al protocolo SuperScrip® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit. (Invitrogen). El RNAm se convirtió a cDNA con la utilización de la transcriptasa reversa AMV en un volumen total de 200µl se incubó a 42°C durante 1 hora. Para la reacción en cadena de la polimerasa 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 se realizó a 55°C por 1 minuto, la extensión fue a 72°C por 1 minuto y un ciclo final de extensión a 72°C.

Se utilizaron oligonucleótidos para CAP, CEMP1, BSP, ALP, AMEL, AMBN, GADPH y se determinó si efectivamente se inhibe la expresión génica por ARNi de CAP, CEMP1 y CAP/CEMP1.

EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL TRADUCCIONAL (WESTERN BLOT)

Se determinó si la expresión de CAP, CEMP1, BSP, AMEL, AMBN, GADPH y proteínas que participan en el proceso de mineralización se inhibe por ARNi de CAP, CEMP1 y CAP/CEMP1 mediante ensayos de Western Blot. Las células se sembraron por triplicado hasta la confluencia. Los cultivos experimentales y controles se cultivaron durante 3, 10 y 15 días. Después del tiempo indicado, las células se rasparon con gendarme, se resuspendieron en PBS y se centrifugaron. La pastilla se lisó con buffer de lisis (1mM EDTA, pH 8.0, 10mM HEPES, 50mM de NaCl, 0.5% tritón X-100, 1mM fenilmetilsulfonilfluoruro, 5 μ de leupeptina y 10 μ g/mlaprotinina). Se determinó la concentración de proteínas y se cargó en cantidades iguales de proteína que fueron sujetas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 %. Las proteínas se transfirieron a membranas Immobilon-PVDF y se bloquearon con solución de bloqueo (Buffer de fosfoproteínas, 5% de leche descremada). Se incubaron los anticuerpos primarios por 1 hora, después se lavó con PBS-Tween 0.1% , 3x durante 10 minutos cada lavado y se incubaron con el segundo anticuerpo. Se revelarán por el método de diaminobenzidina (DAB).

ENSAYOS DE MINERALIZACIÓN.

Los cementoblastos transfectados con ARNi de CAP, CEMP-1 y CAP/CEMP-1 fueron cultivados y mantenidos hasta su confluencia, posteriormente se sembraron en cajas de 6 pozos y fueron tratados con medio DMEM suplementado con 10% de SBF y medio mineralizante. Las células se mantuvieron por 5, 10 y 15 días respectivamente, al cumplirse cada tiempo se retiró el medio DMEM suplementado con 10% de SBF y medio mineralizante; Se fijaron las células con etanol al 96%

por 10 minutos y los nódulos de calcio fueron detectados usando solución saturada de alizarina roja S pH 4.2 (Sigma Chemical Co. St. MO). La tinción residual se removió con PBS y la presencia de nódulos fue observada por microscopia de luz.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA (ALP).

Los cementoblastos transfectados con ARNi de CAP, CEMP-1 y CAP/CEMP-1 fueron cultivados en medio DMEM, suplementado con Suero Fetal Bovino al 10%, incubados en un ambiente 100% de humedad a 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂. Una vez en confluencia se lisaron en 50 µl de buffer de lisis (0.05 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.15 M NaCl, 1% Tritón X 100, 0.5 M PMSF y Complete EDTA-free, inhibidores de proteasas) y en 150 µl buffer de lavado de ALP (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) se sonicaron por 20 s. Se incubaron 5µl de muestra de proteína adicionada con 95µl de buffer de reacción ALP (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 1M dietanolamina, 0.25mM MgCl₂, 10mM pNPP, pH 9.8) a 37°C por 30 minutos con p-nitrofenilfosfato (pNPP; sustrato de la fosfatasa alcalina). La actividad enzimática de fosfatasa alcalina fue expresada en nanomoles de p-nitrofenol por minuto por miligramos de proteína. Los ensayos se realizaron por triplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en los ensayos de Western Blot, qRT-PCR y Actividad de Fosfatasa Alcalina fueron analizados con la prueba estadística Dunnet ($p < 0.05$) con el software Prism5 y Sigma Plot.

RESULTADOS

EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL POR GEN.

A continuación se presentan los resultados correspondientes al porcentaje de inhibición de la expresión génica por ARN de interferencia de CEMP1 y CAP de cada uno de los genes estudiados. Los datos fueron analizados con la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

CEMP1 (PROTEÍNA DEL CEMENTO 1)

El mecanismo de inhibición de la expresión génica es significativo desde tiempos cortos para CEMP1 al utilizar el ARNi de CEMP1, ARNi de CAP y al evaluar el efecto sinérgico utilizando ARNi de CEMP1/CAP, a los 10 días de cultivo, el silenciamiento en la expresión génica se observa disminuido en las condiciones donde se utiliza ARNi de CAP y ARNi de CEMP1/CAP y al día 15 de cultivo el mecanismo de silenciamiento es nulo.

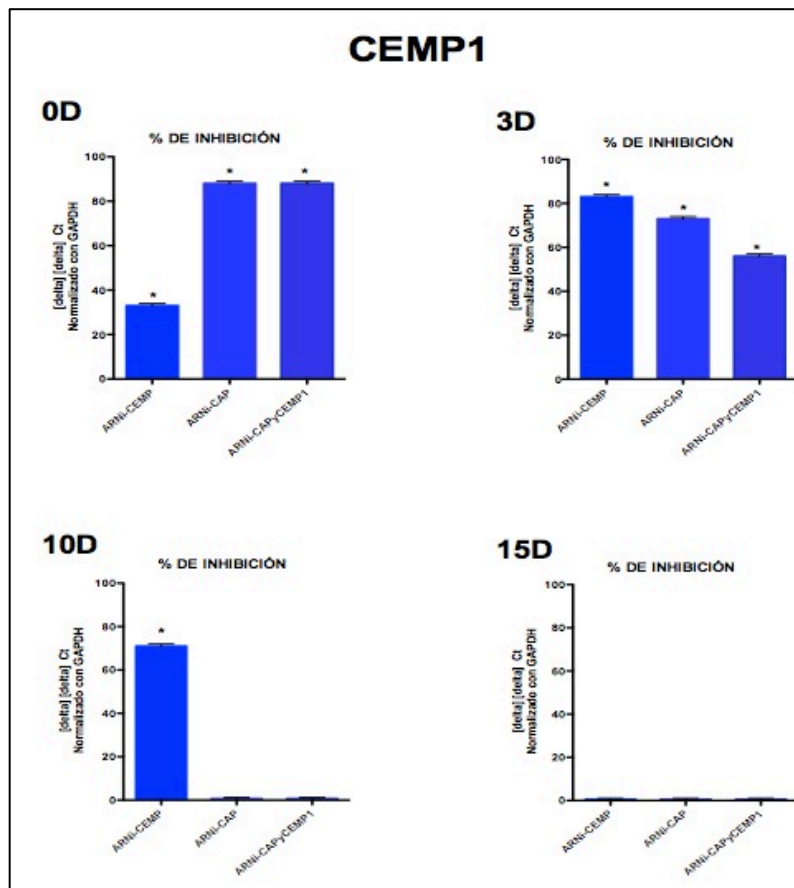


Figura 3. Porcentaje de expresión génica de CEMP1. Los datos fueron analizados con la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

CAP (PROTEÍNA DE ADHESIÓN AL CEMENTO)

El mecanismo de inhibición en la expresión génica es significativo desde tiempos iniciales de cultivo para CAP al utilizar el ARNi de CAP; a los 3 días de cultivo el mecanismo de silenciamiento en la expresión de CAP se sostiene hasta los 15 días al utilizar ARNi de CEMP1, ARNi de CAP y ARNi de CEMP1/CAP.

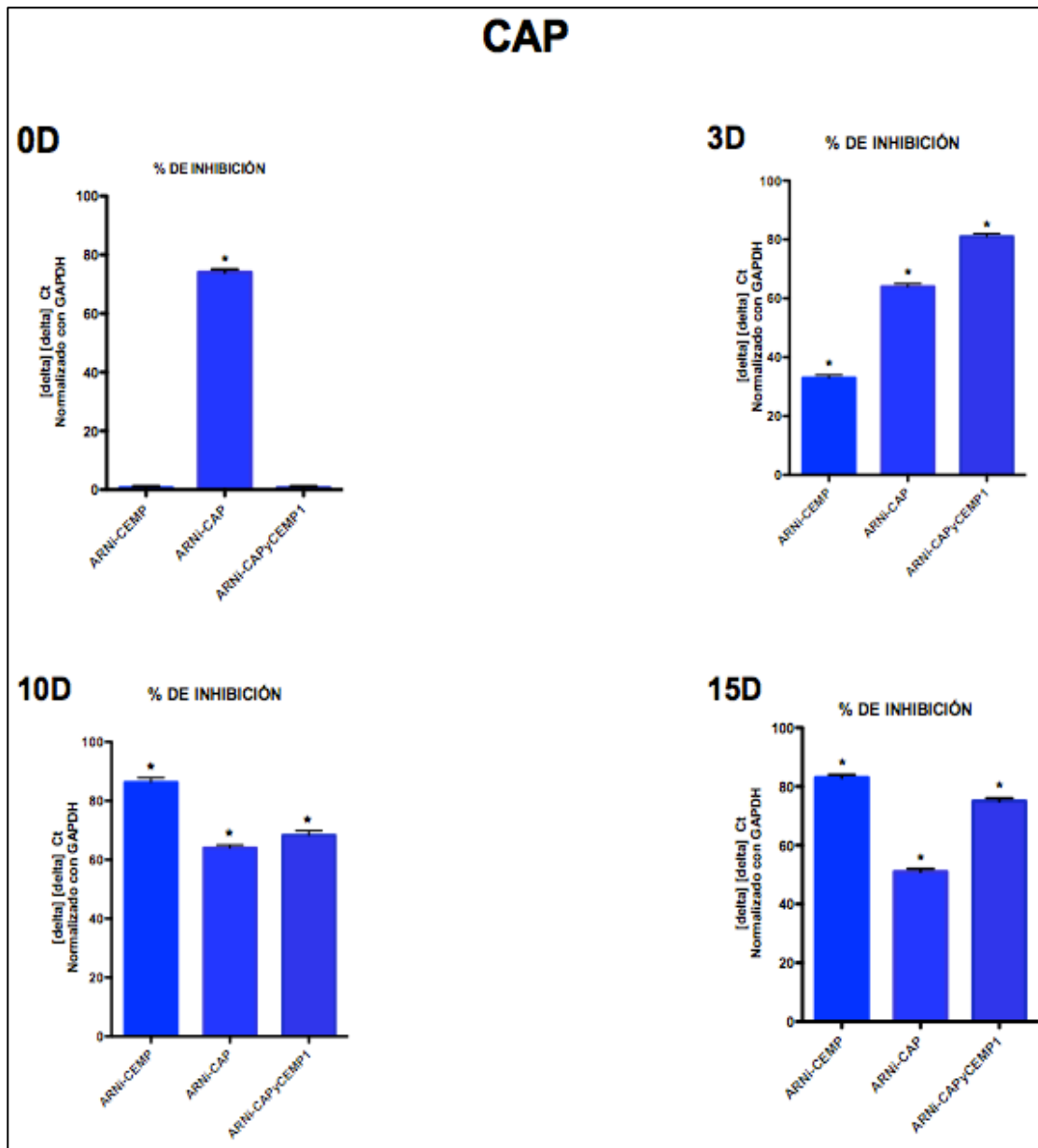


Figura 4. Porcentaje de expresión génica de CAP. Los datos fueron analizados con la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

ALP (FOSTASA ALCALINA)

El mecanismo de inhibición en la expresión génica de ALP es nulo en tiempos iniciales de días de cultivo, sin embargo a partir del tercer día y hasta el décimo día de cultivo, el mecanismo de silenciamiento en la expresión de ALP es significativo al utilizar ARNi de CEMP1, CAP y CEMP1/CAP, el mecanismo de inhibición se mantiene hasta los 15 días de cultivo de manera significativa solo al utilizar ARNi de CAP y se ve revertido en las condiciones donde se utiliza ARNi de CEMP1 y ARNi de CEMP1/CAP.

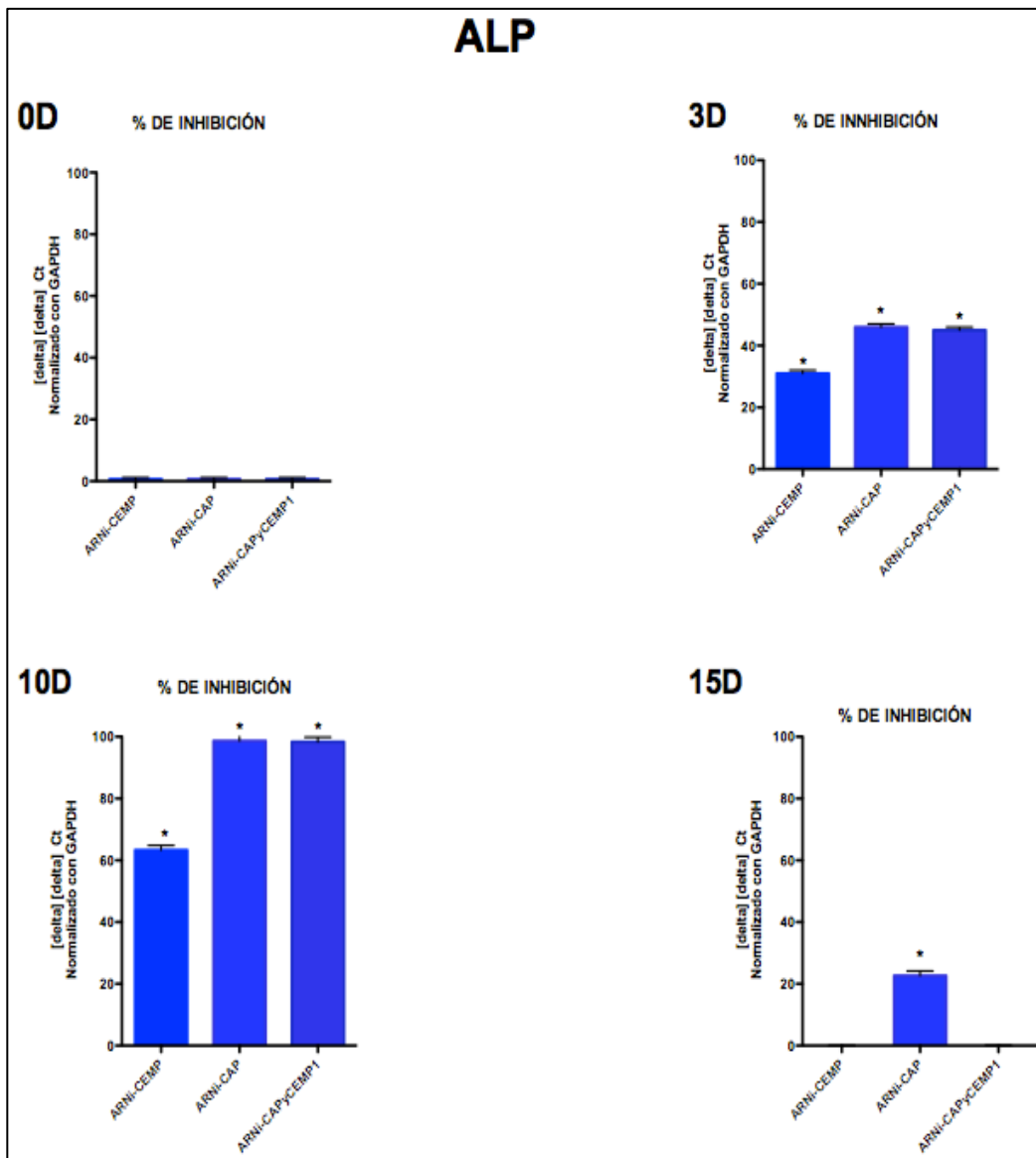


Figura 5. Porcentaje de expresión génica de ALP. Los datos fueron analizados con la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

BSP (SIALOPROTEÍNA ÓSEA)

El mecanismo de inhibición en la expresión génica es significativo desde tiempos cortos para BSP al utilizar el ARNi de CAP y ARNi de CEMP1/CAP, a los 3 días de cultivo es significativo también al utilizar ARNi de CEMP1, el silenciamiento en la expresión génica se mantiene hasta el décimo día en todas las condiciones pero se ve revertido al llegar a los 15 días de cultivo donde el mecanismo de silenciamiento es nulo.

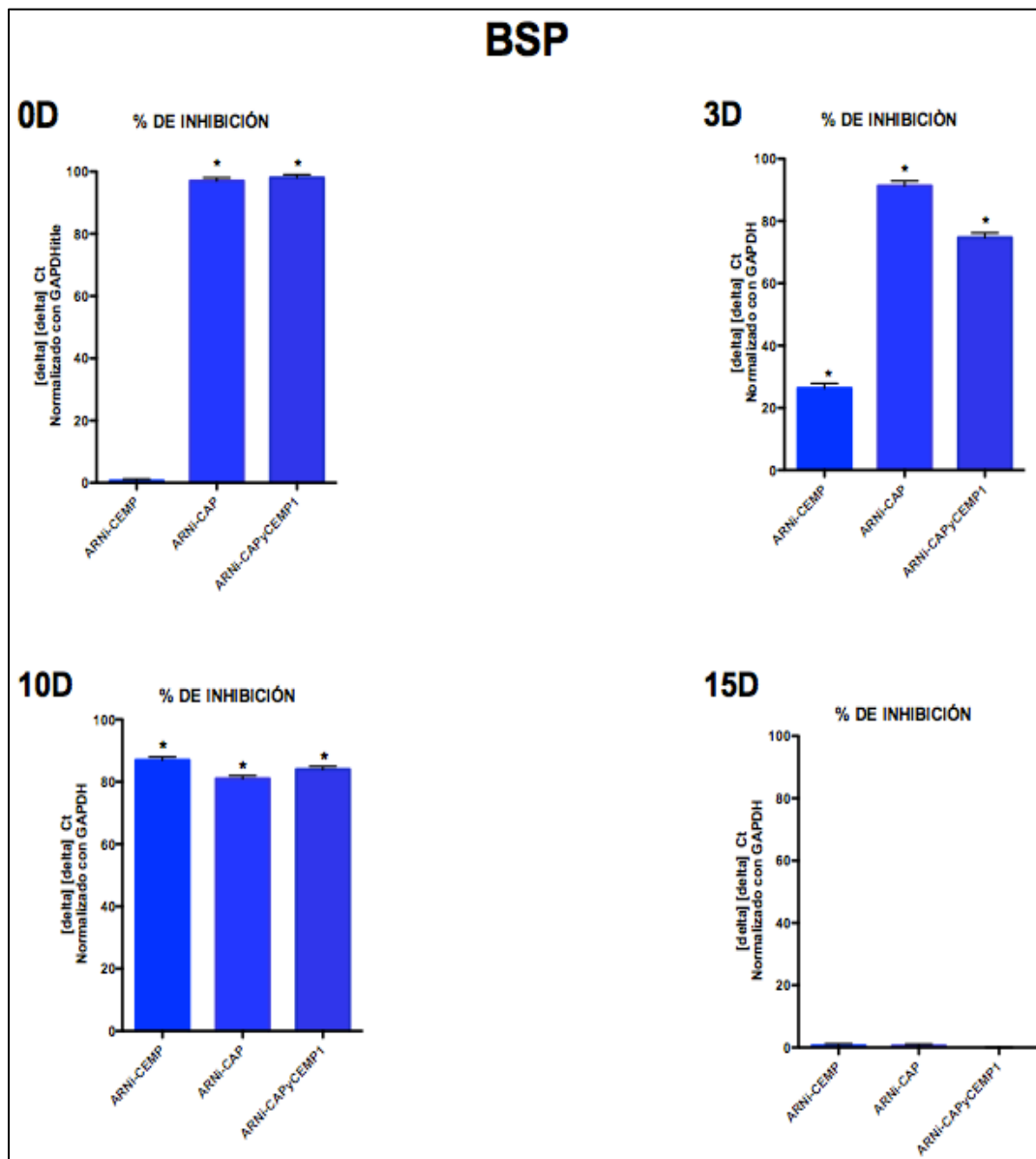


Figura 6. Porcentaje de expresión génica de BSP. Los datos fueron analizados con la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

AMBN (AMELOBLASTINA)

El mecanismo de inhibición en la expresión génica es significativo en tiempos cortos para AMELOBLASTINA (AMBN) al utilizar el ARNi de CAP en el día cero y ARNi de CEMP1 y ARNi de CAP en el tercer día, hacia el décimo día el silenciamiento en la expresión génica es significativo sólo al utilizar ARNi de CEMP1/CAP y el mecanismo se ve revertido al llegar a los 15 días de cultivo en todas las condiciones.

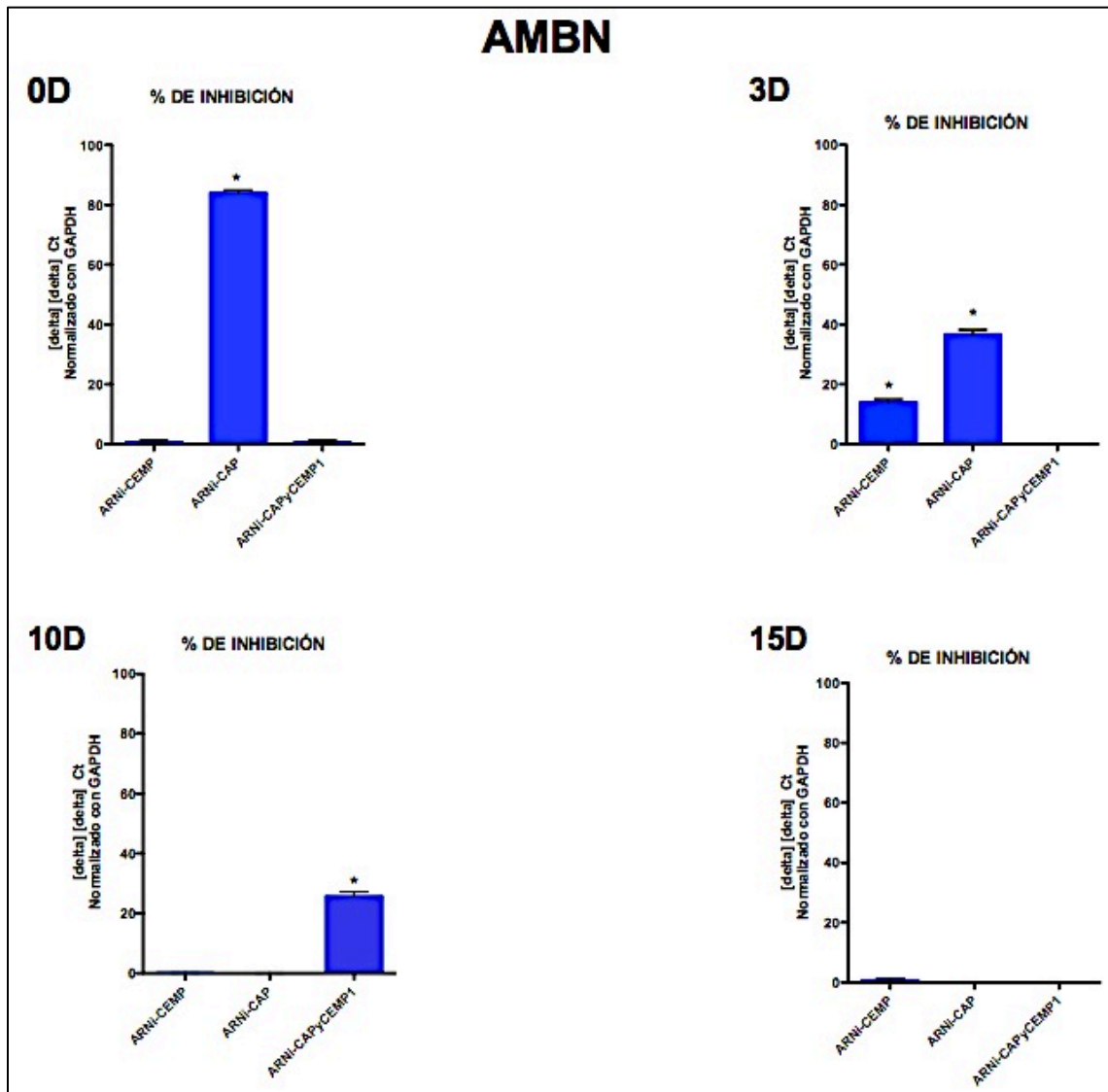


Figura 7. Porcentaje de expresión génica de AMBN. Los datos fueron analizados con la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

AMEL (AMELOGENINA)

El mecanismo de inhibición en la expresión génica es significativo desde tiempos cortos para AMELOGENINA (AMEL) al utilizar el ARNi de CEMP1, ARNi de CAP y ARNi de CEMP1/CAP, hacia el tercer día el efecto se sostiene sólo para la condición de ARNi de CAP, a los 10 días de cultivo, el silenciamiento en la expresión génica se mantiene sólo en el caso de ARNi de CEMP1/CAP y de manera significativa el mecanismo de inhibición por ARNi de CEMP1, CAP y CEMP1/CAP se presenta nuevamente en el décimo quinto día de cultivo.

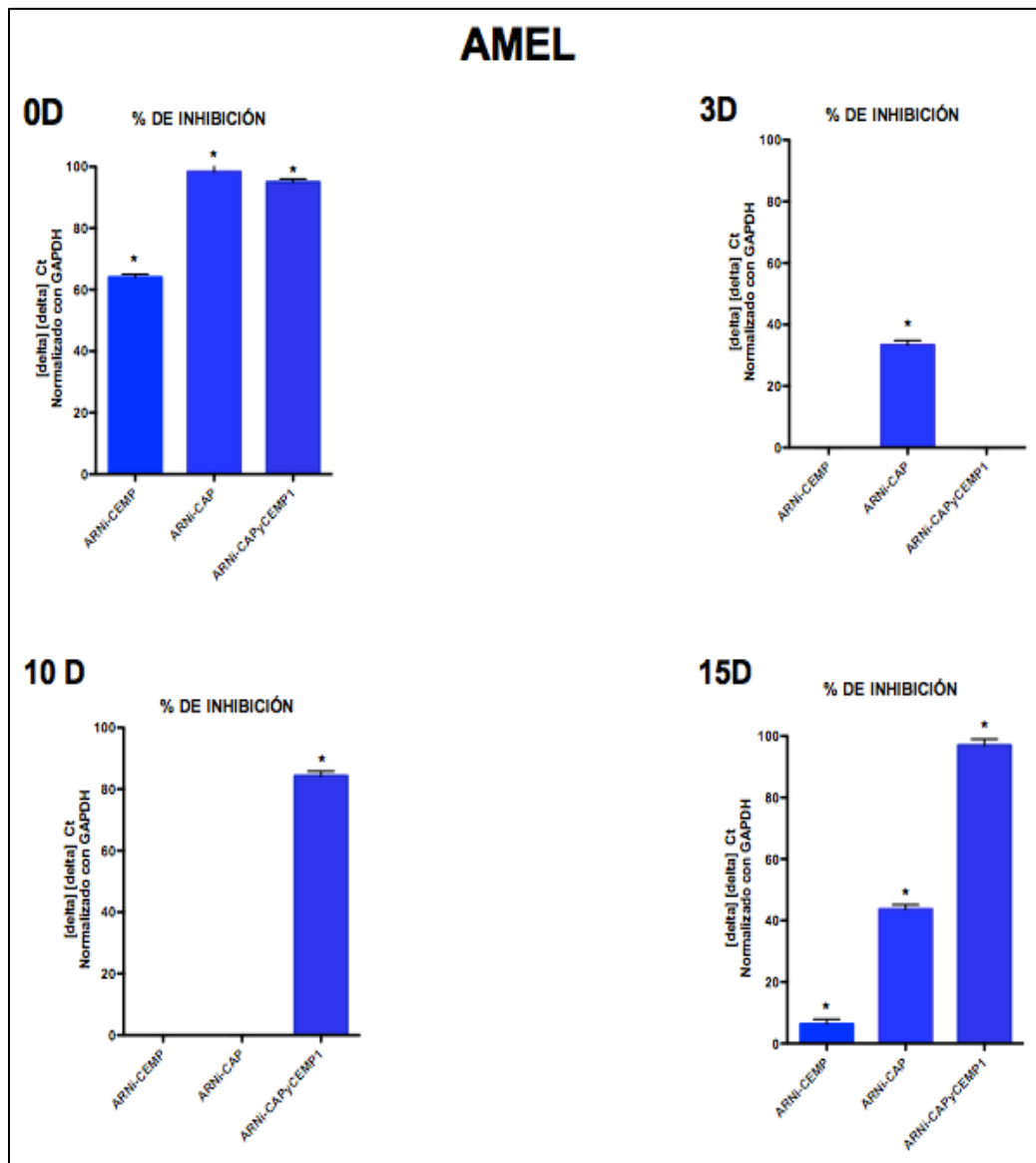


Figura 8. Porcentaje de expresión génica de AMEL. Los datos fueron analizados con la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

RESULTADOS

EXPRESIÓN DEL PRODUCTO GÉNICO A NIVEL TRADUCCIONAL DE CEMP1

Se determinaron los niveles de expresión relativos de CEMP1 en cultivos de cementoblastos humanos bajo las siguientes condiciones: ARNi CEMP1, ARNi CAP y ARNi CEMP1/CAP respecto al control (vector vacío); lo anterior en un curso temporal de 0, 3, 10 y 15 días respectivamente, mostrando reducción significativa en la inhibición de la expresión de la proteína CEMP1 en cada condición por debajo del 70% para el ARNi de CEMP1 y ARNi de CEMP1/CAP y del 50% para el ARNi de CAP, respectivamente.

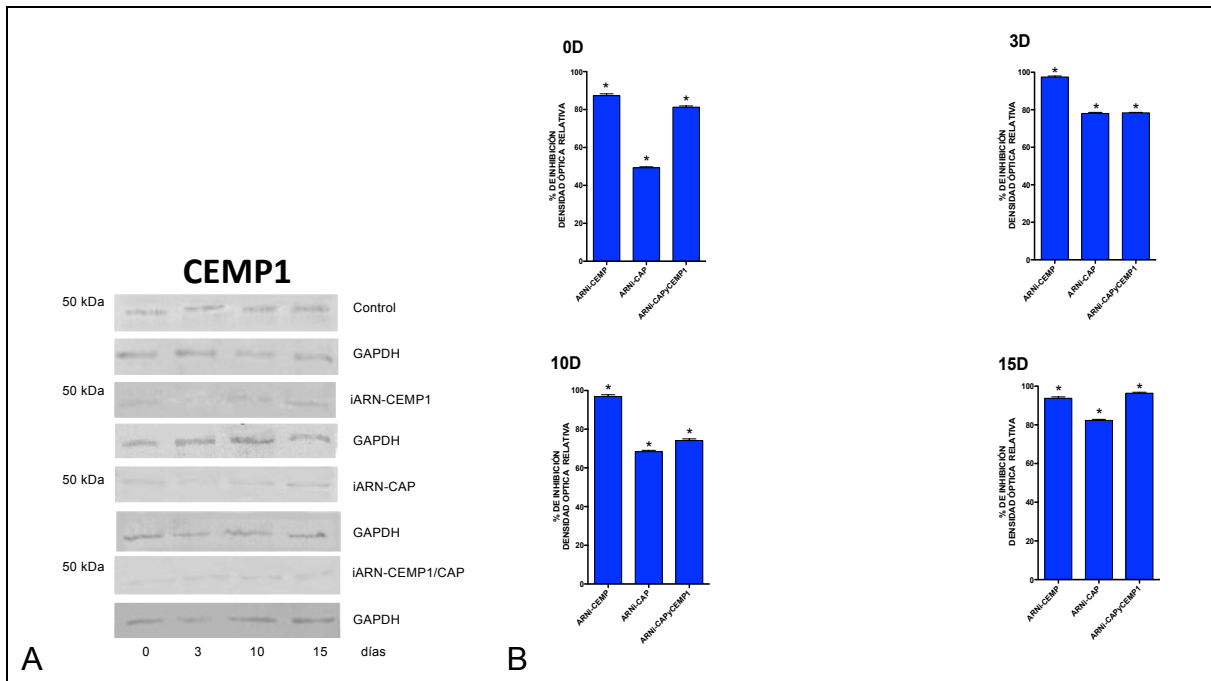


Figura 9. Expresión del producto génico a nivel trauccional de CEMP1. A. Western Blot para la detección de CEMP1 B. Gráfica correspondiente al porcentaje de inhibición de cada ARNi sobre la expresión del producto génico de CEMP1. Los datos fueron analizados con la prueba Dunnet ($p < 0.05$).

RESULTADOS

EXPRESIÓN DEL PRODUCTO GÉNICO A NIVEL TRADUCCIONAL DE CAP.

Se determinaron los niveles de expresión relativos de CAP en cultivos de cementoblastos humanos bajo las siguientes condiciones: control, ARNi CEMP1, ARNi CAP y ARNi CEMP1/CAP respecto al control (vector vacío); lo anterior en un curso temporal de 0, 3, 10 y 15 días respectivamente, mostrando reducción significativa en la inhibición de la expresión de la proteína en cada condición por debajo del 70% para el ARNi de CAP y ARNi de CEMP1/CAP. En el caso del ARNi de CEMP1, la reducción significativa fue a partir del día 3.

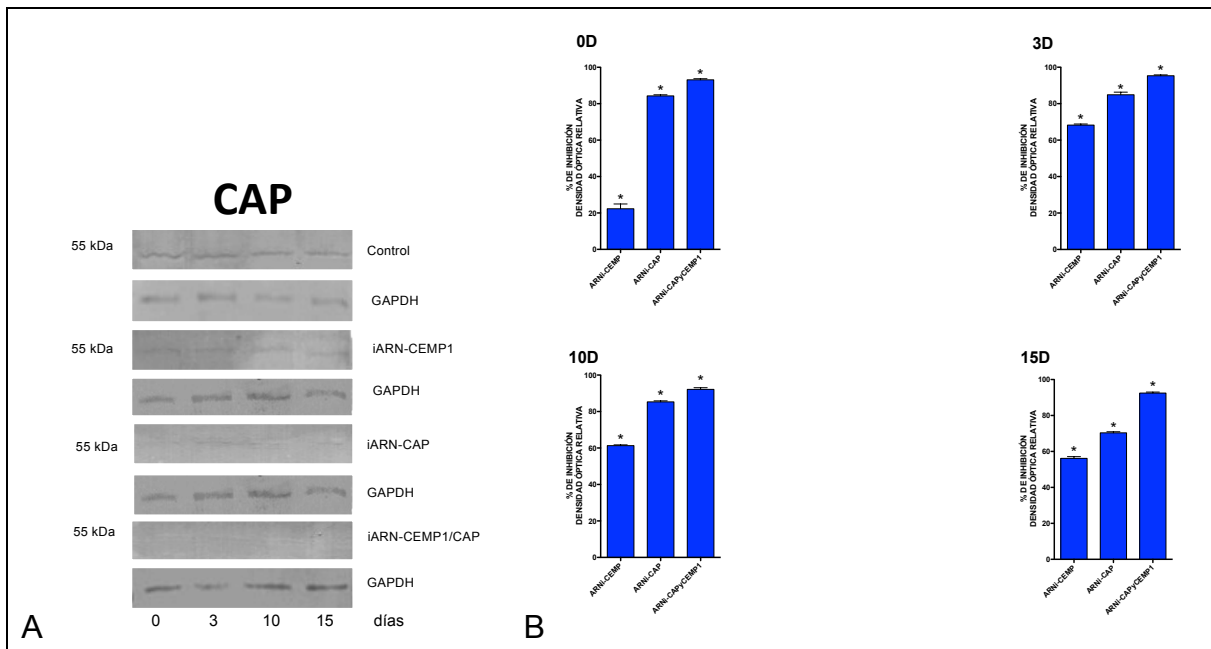


Figura 10. Expresión del producto génico a nivel traduccional de CAP. A. Western Blot para la detección de CAP B. Gráfica correspondiente al porcentaje de inhibición de cada ARNi sobre la expresión del producto génico de CAP. Los datos fueron analizados con la prueba Dunnet ($p < 0.05$).

RESULTADOS

EXPRESIÓN DEL PRODUCTO GÉNICO A NIVEL TRADUCCIONAL DE BSP.

Se determinaron los niveles de expresión relativos de BSP en cultivos de cementoblastos humanos bajo las siguientes condiciones: control, ARNi CEMP1, ARNi CAP y ARNi CEMP1/CAP respecto al control (vector vacío); lo anterior en un curso temporal de 0, 3, 10 y 15 días respectivamente, mostrando reducción significativa en la inhibición de la expresión de la proteína en cada condición por debajo del 70% para el ARNi de CAP y ARNi de CEMP1/CAP. Para el caso de el ARNi de CEMP1, la reducción significativa fue a partir del día 15.

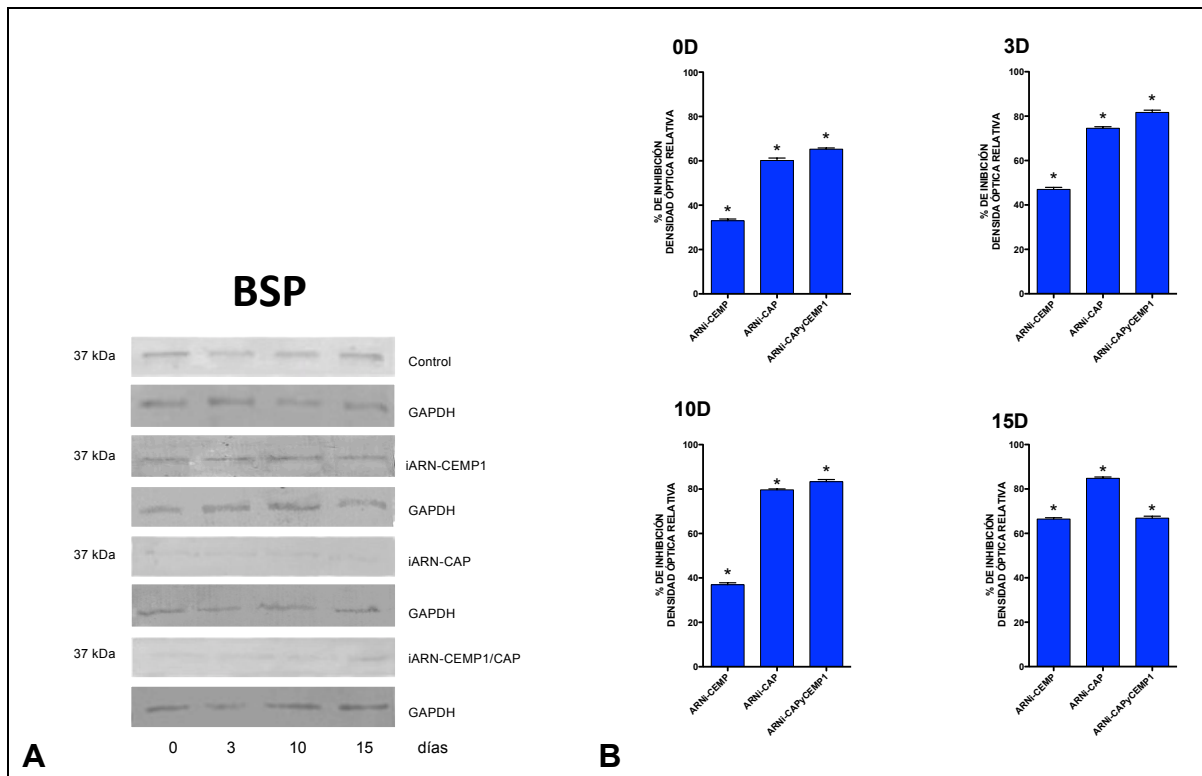


Figura 11. Expresión del producto génico a nivel traduccional de BSP. A. Western Blot para la detección de BSP B. Gráfica correspondiente al porcentaje de inhibición de cada ARNi sobre la expresión del producto génico de BSP. Los datos fueron analizados con la prueba Dunnet ($p < 0.05$).

EXPRESIÓN DEL PRODUCTO GÉNICO A NIVEL TRADUCCIONAL DE AMEL

Se determinaron los niveles de expresión relativos de AMEL en cultivos de cementoblastos humanos bajo las siguientes condiciones: control, ARNi CEMP1, ARNi CAP y ARNi CEMP1/CAP respecto al control (vector vacío); lo anterior en un curso temporal de 0, 3, 10 y 15 días respectivamente, mostrando reducción significativa en la inhibición de la expresión de la proteína en cada condición por debajo del 70% para el ARNi de CEMP1, ARNi de CAP desde tiempos cortos (0 y 3 días) en el caso del ARNi de CEMP la inhibición significativa disminuyó en el día 10 y 15 y para el ARNi de CAP y CEMP1 se mantuvo.

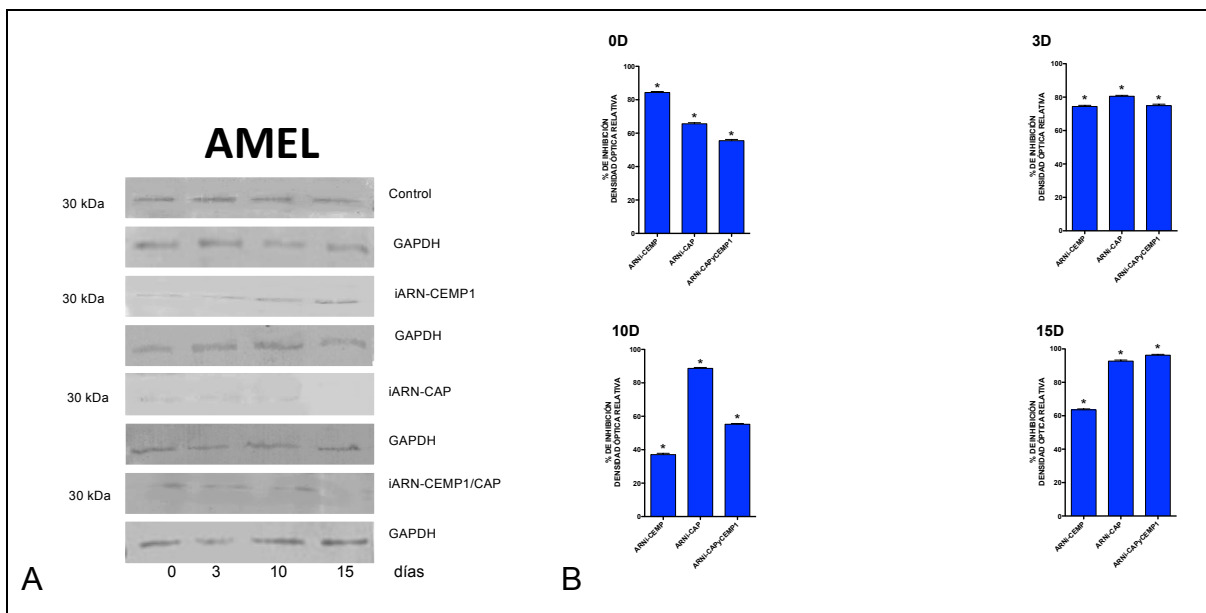


Figura 12. Expresión del producto génico a nivel traduccional de AMEL. A. Western Blot para la detección de AMEL B. Gráfica correspondiente al porcentaje de inhibición de cada ARNi sobre la expresión del producto génico de AMEL. Los datos fueron analizados con la prueba Dunnet ($p < 0.05$).

RESULTADOS

EXPRESIÓN DEL PRODUCTO GÉNICO A NIVEL TRADUCCIONAL DE AMBN

Se determinaron los niveles de expresión relativos de AMBN en cultivos de cementoblastos humanos bajo las siguientes condiciones: control, ARNi CEMP1, ARNi CAP y ARNi CEMP1/CAP respecto al control (vector vacío); lo anterior en un curso temporal de 0, 3, 10 y 15 días respectivamente, mostrando reducción significativa en la inhibición de la expresión de la proteína en cada condición por debajo del 70% desde tiempos cortos (0 y 3 días) en el caso del ARNi de CEMP y CAP, la inhibición significativa disminuyó en el día 10 y 15 y la inhibición de la expresión en el caso del ARNi de CEMP1/CAP se mantuvo.

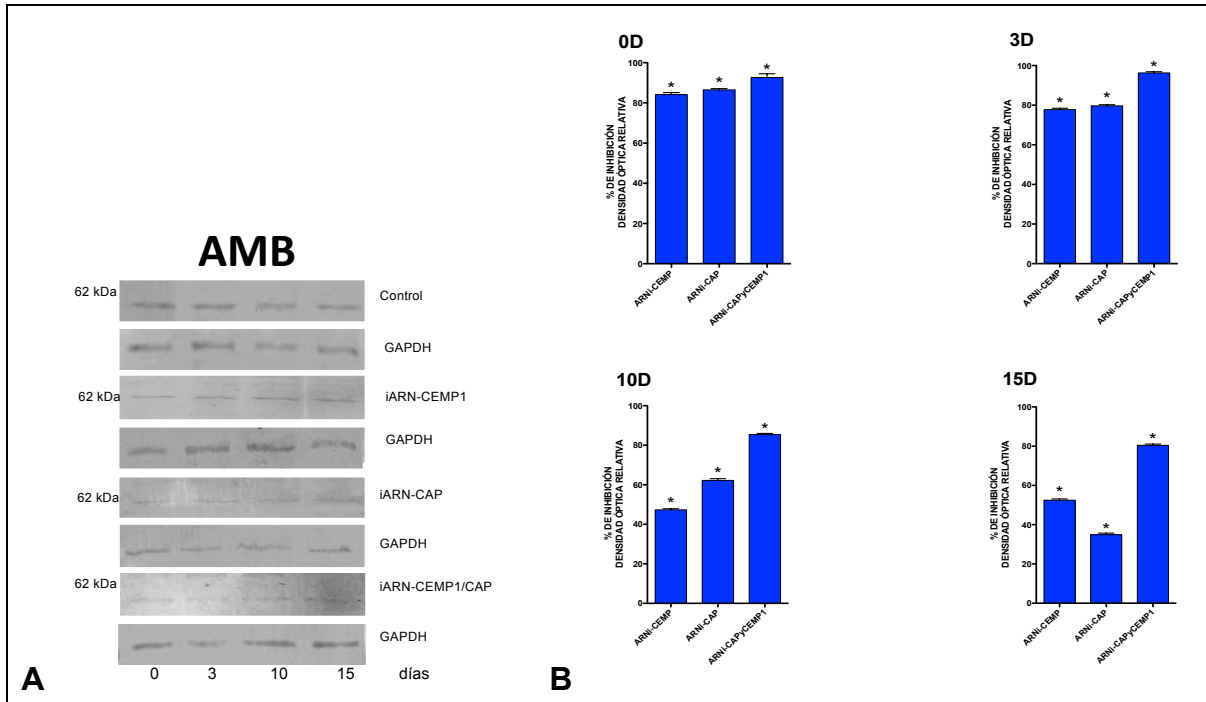


Figura 13. Expresión del producto génico a nivel traduccional de AMBN. A. Western Blot para la detección de AMBN B. Gráfica correspondiente al porcentaje de inhibición de cada ARNi sobre la expresión del producto génico de AMBN. Los datos fueron analizados con la prueba Dunnet ($p < 0.05$).

RESULTADOS

ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA (ALP)

La actividad de fosfatasa alcalina se evaluó bajo las siguientes condiciones experimentales: control (vector vacío), ARNi CEMP1, ARNi CAP y ARNi CEMP1/CAP en un periodo de tiempo de 0, 3, 10 y 15 días respectivamente; para determinar el posible papel de las proteínas cemento específicas (CEMP1 y CAP) sobre una de las moléculas que regulan el proceso de mineralización. Dicha actividad disminuye significativamente desde tiempos cortos (0 y 3 días) al evaluar el ARNi de CAP y para el ARNi de CEMP1 y CAP/CEMP1 la disminución se logró a partir del día 10 y se mantuvo hasta el día 15.

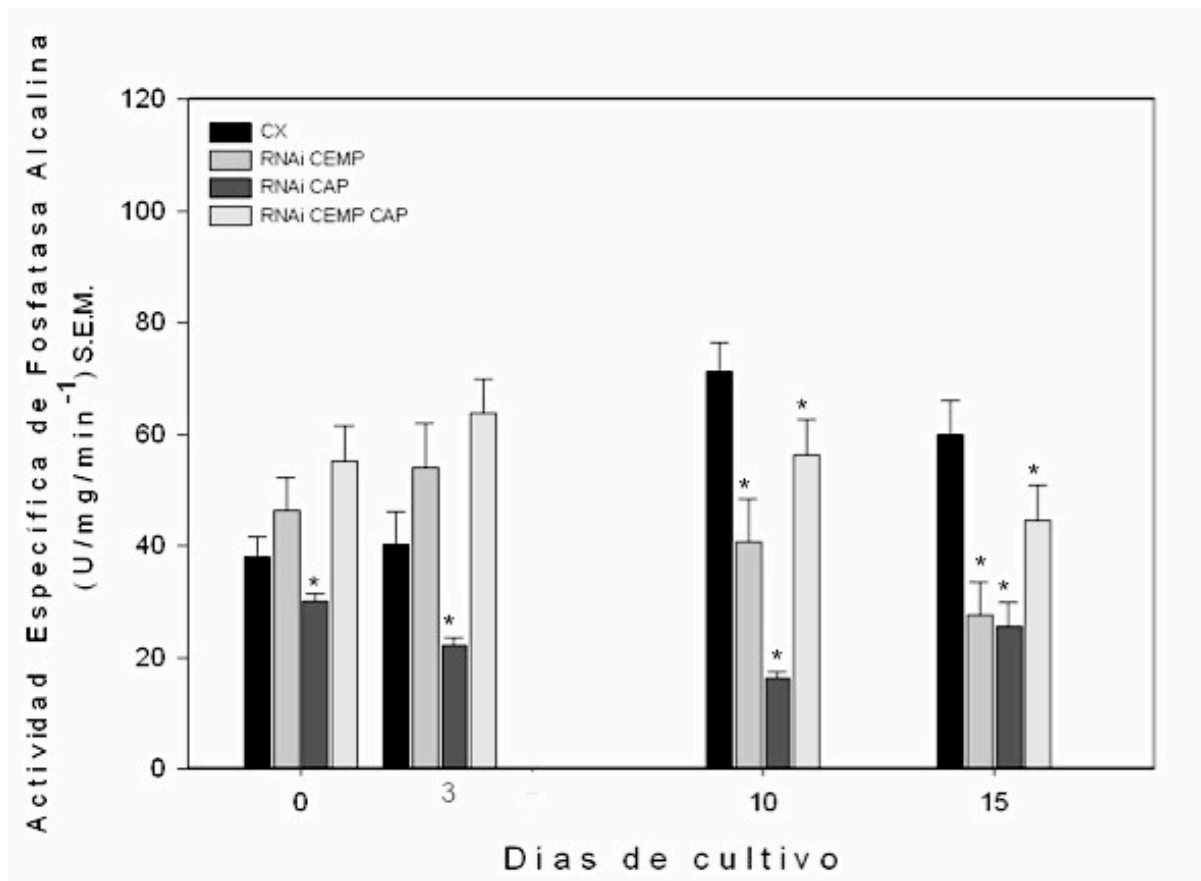


Figura 14. Actividad de Fosfatasa Alcalina. Los asteriscos indican la diferencia estadística $p < 0.001$

RESULTADOS

ENSAYOS DE MINERALIZACIÓN

Para determinar si la formación de nódulos de calcio se ve disminuida al silenciar el gen de CEMP1 y CAP los cementoblastos se mantuvieron por un periodo de tiempo de 0, 3, 10 y 15 días bajo las siguientes condiciones: control (vector vacío), ARNi CEMP1, ARNi CAP y ARNi CEMP1/CAP, al término de cada uno de los periodos de tiempo las células se fijaron y se tiñeron con Alizarina roja. El grupo experimental con ARNi de CAP y CEMP1/CAP mostraron una mayor disminución respecto al control. El grupo experimental con ARNi de CEMP1 disminuye respecto al control pero no respecto al ARNi de CAP.

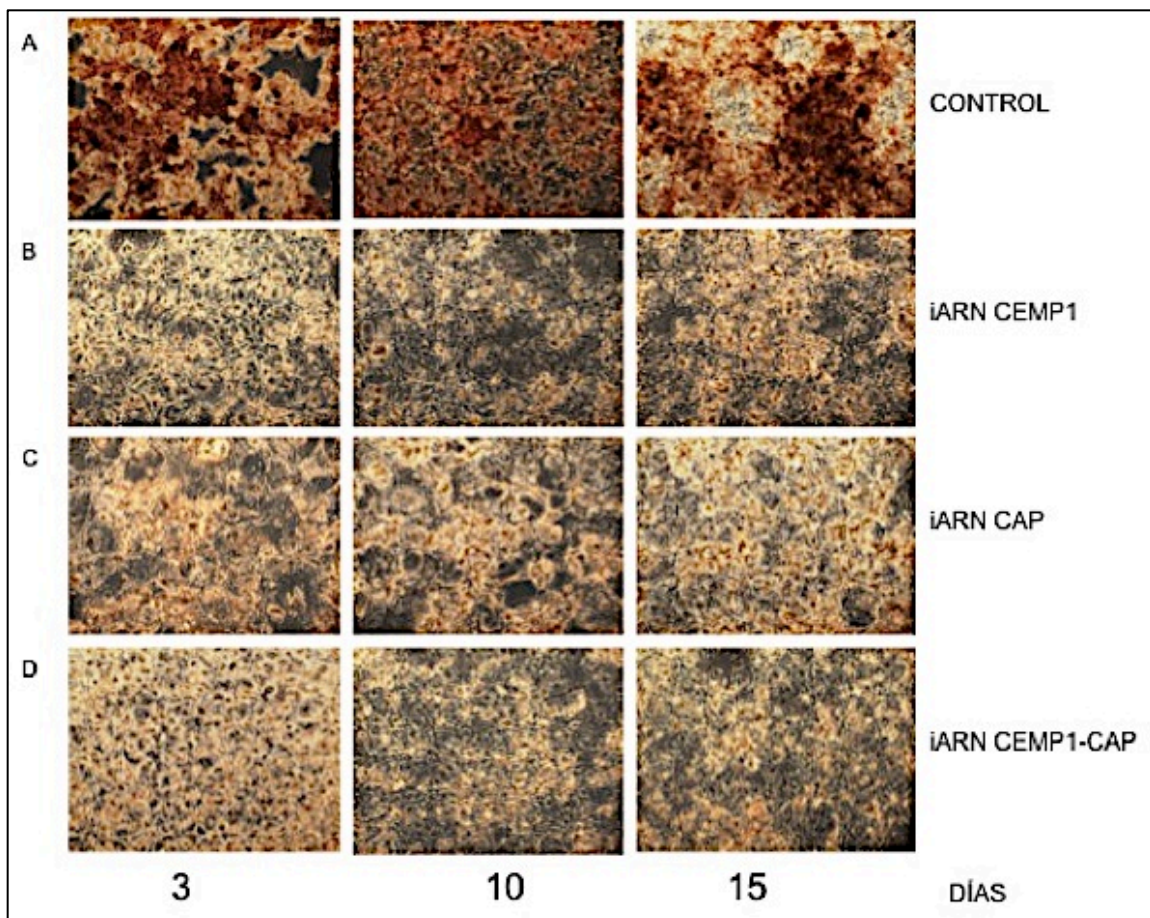


Figura 15. Tinción con Alizarina Roja al 2% en cultivos de cementoblastos durante los distintos periodos de cultivo.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran el establecimiento de un modelo *in vitro* que permite una aproximación al entendimiento de una de las formas en que los sistemas biológicos regulan la expresión de sus genes involucrados en un evento en común, mediante el mecanismo denominado silenciamiento, knockdown o interferencia.⁸⁹ Desde que Fire y Mello⁹² en un lapso muy corto y productivo redefinieron la interferencia mediada por ARN, en organismos modelo como *Caenorhabditis elegans*, el mecanismo del ARN de interferencia (ARNi) ha surgido como una herramienta poderosa en el estudio de la función genética en mamíferos. En este sentido, se logró mediante el presente trabajo, la generación de una línea celular de cementoblastos humanos que expresa de manera estable el ARN de interferencia de las proteínas hasta la fecha consideradas cemento específicas: CEMP1 y CAP. Lo que permite generar hallazgos, como podría ser, el reconocer si la modulación de sus funciones en cementogénesis y biomineralización ocurre de manera sinérgica entre ellas (CEMP1 y CAP); así como su papel –si es que lo hay- en la modulación positiva o negativa de la expresión génica y el producto final de otras proteínas no colágenas y de matriz extracelular del esmalte, que hasta estos momentos se sabe que participan en procesos de biomineralización.

La interferencia por un lado del ARN de CEMP1 y de CAP de forma individual influye de manera significativa en la expresión de BSP y ALP que son moléculas presentes en fases tempranas para promover la formación de matriz mineralizada. Por otro lado, la interferencia de CEMP1 y CAP, al parecer también parecer impactar de manera significativa en la expresión génica y traduccional de AMEL y AMBN, consideradas hasta hace poco como proteínas propias de la matriz del esmalte, pero que, sin embargo actualmente se reconoce que participan en el reclutamiento, ensamblaje y direccionalidad de precursores para fosfato octacálcico e hidroxiapatita y no sólo en el contexto de esmalte dental sino para tejidos mineralizados diversos.

La Fosfatasa Alcalina (ALP) es una proteína que participa en el metabolismo del fosfato y en la formación de tejidos biomineralizados. Se ha descrito que participa tempranamente, tanto en cementogénesis como en osteogénesis por lo que, su expresión y actividad en células formadoras de tejido mineralizado es un parámetro que nos permite entender este mecanismo. Su actividad enzimática está asociada a una actividad transferasa-fosfatasa, es decir, es responsable de proveer los fosfatos necesarios para formación de precursores de hidroxiapatita, además de que, se ha demostrado que su actividad es crucial para la formación y crecimiento del cemento.^{68,94,95} Los resultados aquí reportados muestran que el ARN interferente de CEMP1 (ARNi-CEMP1) disminuye la expresión génica de ALP en cementoblastos, en un 70%, a partir de 3 días de cultivo, manteniendo un porcentaje alto de inhibición hasta los 10 días donde la disminución es de alrededor del 40%, para posteriormente descender y evidenciar de esta manera que el efecto se ve revertido. El efecto del ARN interferente de CAP (ARNi-CAP) sobre ALP, al igual que el de ARNi-CEMP1 se observa a partir del 3er día de mantenimiento de cultivo, pero de manera significativa el porcentaje de inhibición es mayor a los 10 días con un 95% y se mantiene hasta los 15 días; demostrando que contrario a lo que sucede con el interferente de CEMP1, el efecto no es anulado. Importante es señalar que, el efecto sinérgico sobre ALP al utilizar los 2 interferentes es significativo inhibiendo la expresión en un 95% al décimo día, coincidiendo de esta forma con lo reportado para el caso en particular del ARNi-CAP. En lo que respecta al análisis de la actividad enzimática de ALP, los datos no distan de ser opuestos a lo obtenido para la expresión del gen, ya que es justamente el interferente de CAP el que desde periodos tempranos impacta en la actividad de la enzima; también lo hace el ARNi-CEMP pero en menor proporción. Lo anterior podría sugerir que es CAP la responsable de modular el efecto sinérgico.

La Sialoproteína ósea (BSP), es una proteína de la cual se ha reportado que participa como nucleador potente y específico *in vitro*⁸⁵ para los cristales de hidroxiapatita^{96,97}, tiene una asociación precisa con agregados minerales en estadios tempranos y se une fuertemente a hidroxiapatita. Los resultados aquí

reportados muestran que el interferente de CEMP1 promueve la inhibición de la expresión génica de BSP en cementoblastos, en un 20% desde el tercer día y alcanza 80% de inhibición alrededor del décimo día, donde al final del periodo de mantenimiento del cultivo, es decir al os 15 días, el efecto del ARNi-CEMP1 se ve revertido. El efecto del ARNi-CAP sobre BSP, al igual que en el caso de ALP, se observa a partir del día inicial y mantiene su potencial de interferencia en un 95% a través del tiempo (día 3 y 10 de cultivo) siendo al final del periodo de mantenimiento del cultivo donde el efecto es nulo. El efecto sinérgico parece ser favorecido desde tiempos tempranos y se mantiene hasta el día 10 en correspondencia con el ARNi-CAP, sin embargo cabe destacar que podría ser el décimo día crucial en la expresión del gen que codifica para BSP y donde la mayor inhibición se ve reportada, de manera interesante se observa que al día 15 no hay efecto de silenciamiento que podría sugerir en correspondencia con lo reportado en diversos estudios.^{71,96,97} al respecto de que tal vez la modulación de la expresión del gen de BSP en cementogénesis y mineralización es en etapas tempranas y que al llegar a este periodo de tiempo son otros los mecanismos que inciden en modular su expresión. En lo que respecta al análisis de la expresión del producto génico por Western-Blot, se observa que la inhibición en la actividad propia de la proteína BSP se mantiene constante, oscilando entre el 80 y 90% de inhibición de su expresión desde fases tempranas hasta el día 15, siendo evidentemente el ARNi-CAP y en sinergia con CEMP1 donde residen los efectos observados.

Amelogenina (AMEL) y Ameloblastina (AMBN) son dos proteínas que han despertado gran interés por el hecho de que diversos estudios^{72, 73, 74,77} sugieren que son proteínas que además de estar en la matriz del esmalte, también participan en eventos tales como promover diferenciación y mineralización en diversas células mesenquimales, incluyendo odontoblastos, osteoblastos y cementoblastos⁹⁸. Se sugiere que amelogenina y ameloblastina inducen la expresión de BSP y que se expresan durante el depósito del cemento radicular.⁹⁹ Se ha comprobado su participación no sólo en la mineralización del esmalte, sino que además regulan procesos como proliferación, diferenciación, adhesión y

migración celular.^{100,101,102} Por lo anterior y considerando la importancia que las proteínas del esmalte han adquirido, nuestros resultados demuestran que el ARNi-CEMP1 reduce sólo de manera significativa la expresión del gen de AMEL en periodos tempranos y en el curso del tiempo, al 3er y 10 día no hay mayor efecto en la interferencia de su expresión. Para el caso de CAP el efecto de inhibición está presente desde el día inicial, en casi un 100% siendo también en este periodo de tiempo donde podría ponerse en evidencia un efecto sinérgico muy probablemente ligado a CAP. Contrariamente a lo reportado a nivel génico, en el análisis por Western-Blot para reconocer el efecto del ANRi-CEMP1 y ARNi-CAP sobre la expresión de la proteína Amelogenina, el porcentaje de inhibición es constante desde el día cero hasta el día 15, oscilando entre un 80 % y 90%; observándose que el interferente que menor efecto tiene sobre su expresión sin dejar de ser significativo es el ARNi-CEMP1. La sinergia en el caso de AMEL, parece estar ligada a CAP.

Los resultados para AMBN, evidencian que el ARNi-CAP reduce en un 90 % la expresión del gen en periodos iniciales, y que el efecto se mantiene hasta el día 3, sin embargo en el transcurso del tiempo, al día 10 y 15 el efecto es nulo. Los resultados no muestran de manera contundente que el ARNi-CEMP1 tenga efectos en la inhibición de la expresión de AMBN. A nivel traduccional, el ensayo de Western-Blot demuestra el efecto opuesto, por lo que podemos observar que la reducida inhibición en expresión génica de AMBN no es proporcional al efecto que observamos en su producto proteico, donde desde fases tempranas el porcentaje de inhibición es significativamente alto, 90-95% en todas las condiciones. Al curso de los 15 días de mantenimiento de cultivo el efecto inhibitorio aunque reduce no lo hace de forma contundente y aún al final se mantiene una inhibición del 50% y el mecanismo de sinergia parece ser es el más evidente aunque no es claro si esta ligado al ARNi-CEMP1 o al ARNi-CAP.

Sin lugar a dudas hemos evidenciado que las proteínas hasta la fecha cementoespecíficas CAP y CEMP1 tienen un impacto en la expresión génica y traduccional sobre otras proteínas involucradas en mineralización, sin embargo la

metodología propuesta en este trabajo y las condiciones que se consideraron para evaluar nos permitieron observar por un lado que el diseño y síntesis del ARN de interferencia está perfectamente dirigido contra la secuencia blanco de CAP y CEMP1 respectivamente, esto lo demostramos en los ensayos donde es evidente que el porcentaje de mayor inhibición para CEMP1 es en efecto al utilizar su propio interferente y para el caso de CAP la situación es igual. Sin embargo, al pretender analizar si existe o no una condición de sinergia entre ambas proteínas, se demuestra que existe cierta proporcionalidad y relación entre el ARNi-CAP y el ARNi-CEMP1/CAP lo que sin duda podría estar sugiriendo que es la proteína de adhesión al cemento CAP la que tiene la función de orquestar y quizás coordinar mecanismos como nucleación asociados a otras moléculas, que pueden cumplir el papel de ser los iniciadores del proceso de biomineralización.

Tomando en cuenta lo reportado y hasta la fecha reconocido en la estructura génica, proteica y funcional de CAP, por diversos investigadores, sería válido poder diseñar alguna otra herramienta que complemente las evidencias aquí mostradas en el papel biológico-funcional de CAP, quizás para reconocer si dentro de su estructura, dentro de su splicing alternativo, de su localización espacial, así como en su multifuncionalidad reportada, sea donde residen los mecanismos moleculares que le permiten no sólo asociarse a otras moléculas que participan en procesos similares, sino de alguna manera regularlas.

CONCLUSIONES

- Nuestros datos sugieren que al silenciar la expresión del gen para las proteínas CEMP1 y CAP se ve disminuida la expresión de genes que participan en el proceso de mineralización, tal es el caso de ALP, BSP, AMEL y AMBN.
- Lo anterior se observa a nivel de expresión génica en tiempos cortos e iniciales y cercanos al décimo y quinceavo día tal efecto se ve revertido. Sin embargo a nivel de expresión proteica hemos comprobado que el efecto se mantiene a través del tiempo. Así como en la actividad enzimática de ALP donde a través del tiempo se ve disminuida.
- Los hallazgos se ven reforzado con el efecto que tiene el ARNi de CEMP1 y CAP sobre la disminución en la formación de nódulos de calcio en los ensayos de mineralización desde periodos cortos de tiempo.
- Es evidente que tanto a nivel de expresión génica como a nivel de expresión proteica el ARNi de CAP sugiere tener un efecto mayor en el bloqueo de la expresión y que al utilizar ambos ARNi el efecto se incrementa, lo que nos sugiere que es probable que CAP tenga mecanismos moduladores sobre la expresión de estas proteínas no colágenas, sin embargo faltaría dilucidar cuales son dichos mecanismos.

REFERENCIAS

1. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Clinical periodontology and implant dentistry. 4^a edition Blackwell Munksgaard, Blackwell Publishing Company (2003)
2. Carranza FA, Newman MG, Clinical periodontology 8^a edition. Section one. The normal periodontium. WB Saunders Company USA 1996.
3. Hassell M, Thomas, Tissues and cells of the periodontium, *Periodontology* 2000. 1993; 3:9-38.
4. Nanci A, Bosshardt D. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology* 2000. 2006; 40 : 11-28.
5. Mariotti Angelo. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontology* 2000. 1993; 3: 39-63.
6. Lekic P, McCulloch CAG, Periodontal ligament cell populations: the central role of fibroblasts in creating unique tissue. *The Anatomical Record*. 1996; 245: 327-341.
7. Bartold PM, Narayanan AS, Molecular and cell biology of health and diseased periodontal tissues. *Periodontol* 2000. 2006; 40; 29-49.
8. Komatsu K. Mechanical Strength and viscoelastic response of the periodontal ligament in relation to structure. *J Dent Biomech*. 2010. 1: 1-18.
9. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J *et al*, Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-155.
10. Itaya T, Kagami H, Okada K, Yamawaki A, Narita Y, Inoue M, Sumita Y, Ueda M. *J Periodontal Res*. 2009. 44: 425-433.
11. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka KI, Inoue T, Regulatory Mechanisms of periodontal regeneration *Microscopy Research and Technique* 2003; 60: 491-502.
12. Lekic P, McCulloch CAG, Periodontal ligament cell populations: the central role of fibroblasts in creating unique tissue. *The Anatomical Record*. 1996; 245: 327-341.
13. Cho MI, Garant PR, Development and general structure of the periodontium. *Periodontol* 2000. 2000; 24: 9-27.
14. Nakae H, Narayanan AS, Raines E, Page RC. Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum. *Biochemistry* 1991; 20: 7047-7052.
15. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology* 2000 2000; 24: 73-98.
16. Bartold PM and Narayanan AS. Biology of the periodontal connective tissues. Quintessence. Publishing Co, Inc. 1998 Carol Stream, Illinois, USA.
17. Thomas HF, Kollar EJ. Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme. *Arch Oral Biol*, 1989; 34: 27-35.
18. MacNeil RL, Thomas HF. Development of the murine periodontium. Role of basement membrane in formation of a mineralized tissue on the developing root dentin surface. *J Periodontol*, 1993; 64: 95-102.
19. Furtado GP, Sallum EA, Sallum AW, Zaffalon CM, de Toledo S, Nociti JFM. Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci*, 2005; 12: 651-658.
20. Pitaru S, McCulloch CA, Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res* 1994; 29: 81-94.
21. Bosshardt, DD y Knut Selvig, "Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root". *Periodontology* 2000 Vol.13 (1997):41-75.
22. Zeichner-David, M. *et al*, "Role of Hertwig's Epithelial Root Sheath Cells in Tooth Root Development". *Developmental Dynamics*. Vol. 228 (2003):651- 663.
23. Luan, X. *et al*, "Evolution and Development of Hertwig's Epithelial Root Sheath". *Developmental Dynamics*. Vol. 235 (2006):1167-1180.
24. Gottlieb, B. "Biology of the Cementum". *J. Periodontol*. Vol.13 (1942):13-17.
25. Chai, Y. *et al*. "Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis". *Development* Vol. 127 (2000):1671-1679.
26. Orban, B. *Histología y Embriología Bucal* St. Louis: Ed. Mosby. 1969. Págs. 154-172.
27. Paynter, K.J. y G. Pudy. "A study of the structure, chemical nature, and development of cementum in the rat". *Anat.Rec*. Vol. 131 (1958):233-252.
28. Thomas, H.F., "Root formation". *Int. J. Dev. Biol*. Vol.39 (1995):231-237.
29. Diekwisch, Thomas. "Developmental Biology of Cementum". *Int. J. Dev. Biol*. Vol. 45 (2001):695-706.
30. Slavkin, H. *et al*, "Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium". *J Periodont Res* Vol. 23 (1988):28-40.

31. Lin, N-H. *et al*, "Stem cells and periodontal regeneration". Australian Dental Journal Vol.53 (2008):108-121.
32. Slavkin, H. *et al*, "Human and mouse cementum proteins immunologically related to enamel proteins". Biochimica et Biophysica Acta Vol. 991 (1989):12- 18.
33. Ten Cate, AR, "The role of epithelium in the development, structure and function of the tissues fo tooth support". Oral Diseases Vol.2 (1996):55-62.
34. Bosshardt, DD. y A. Nanci. "Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cemenogenesis in porcine teeth". J Clin Periodontol. Vol.31 (2004):184-192.
35. Bosshardt DD, Schroeder HE. Establishment of acellular extrinsic fiber cementum on human teeth. A light –and electron- microscopy study. Cell tissue Res, 1991; 263: 323-336.
36. Bosshardt DD, Schroeder HE. Initiation of acellular extrinsic fiber cementum on human teeth. A light –and electron – microscopy study. Cell tissue Res, 1991; 263:311-324.
37. Grzesik W, Narayanan A.S. Cementum and periodontal wound healing and regeneration *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13: 474-484.
38. Arzate H, Olson WO, Page RC, Gown AM, Narayanan S, Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J*. 1992a; 6: 2990-2995.
39. Arzate H, Jiménez GLF, Álvarez PMA, Landa A, Bar KI, Pitaru S, Immunolocalization of a human cementoblastoma conditioned médium derived protein. *J Dent Res*. 2002; 81: 541-546.
40. Alvarez PMA, Pitaru S, Alvarez FO, Reyes GJ, Arzate H, Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line, *J Struc. Biol*. 2003; 143:1-13.
41. Álvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Carmona-Rodríguez B, Arzate H. Molecular cloning, expresión and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP23). *Bone* 2006; 38: 409-419.
42. Villareal-Ramírez E, Moreno A, Mas-Oliva J, Chávez-Pacheco J, Narayanan AS, Gil-Chavarría I, Zeichner-David M, Arzate H. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biomineralization. *BBRC* 2009; 384: 49-54.
43. Carmona-Rodríguez B, Álvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, García-Hernández A, Suárez-Franco J, Chavarría I, Villareal E, Arzate H. Human cementum protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblast. *BBRC* 2007; 358: 763-769.
44. Kémoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Cote-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brundel G, Salles JP. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel Matrix derivates (EMD) *in vitro*. *Cell Tiss Res* 2006; 329: 283-94.
45. Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernández-Lagunas L, Díaz de León L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodontol Res* 1996; 31: 144-148.
46. Kitagawa M, Kudo Y, Ogawa I, Abiko Y, Miyauchi M, Takata T. Effect of F-spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *BBRC* 2006; 309: 1050-1056.
47. Kémoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Cote-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brundel G, Salles JP. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel Matrix derivates (EMD) *in vitro*. *Cell Tiss Res* 2006; 329: 283-94.
48. Uwanogho, Dafe A., *et al*, "Molecular Cloning, Chromosomal Mapping, and Developmental Expression of a Novel Protein Tyrosine Phosphatase-like Gene". *Genomics* Vol. 62 (1999):406-416.
49. Saito, M. *et al*, "Expression of Cementum-derived Attachment Protein in Bovine Tooth Germ During Cementogenesis". *Bone* Vol.29 No.3 (2001): 242- 248.
50. Wu D-Y, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan A-S. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment. *J Bone Mineral Res*. 1996: 11; 686-692.
51. McAllister, B. *et al*. "Isolation of a fibroblast attachment protein cementum". *J Periodontal Research*. Vol. 25 (1990):99-105.
52. Valdes de Hoyo A, Hoz Rodríguez, Arzate H, Narayanan A-S. Isolation of protein-tyrosine Phosphatase-like Member-a Variant from cementum. *J Dent Res*. 2012: 91; 203-209.
53. Arzate, H. *et al*, "Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture". *Bone Miner* Vol.18 No.1 (1992b):15-30.
54. Handa, K, *et al*, "Cementum Matrix Formation in vivo by Cultured Dental Follicle Cells". *Bone* Vol.31 No.5 (2002):606-611.
55. Arzate, H *et al*, "Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells *in vitro*". *J Period Res* Vol.33 No.5 (1998):249-258.
56. Barkana, I *et al*. "Cementum attachment protein manifestation is restricted to the mineralized tissue forming cells of the periodontium". *Eur J Oral Sci*. Vol. 106 No.1 (1998):357-64.

57. Saito, M. y S. Narayanan, "Signaling Reactions Induced in Human Fibroblasts During Adhesion to Cementum-Derived Attachment Protein". *JBMR*. Vol.14, No.1 (1999):65-72.
58. Komaki, M. *et al*, "Role of MAP kinases p42erk-2/p44erk-1 in Cementum-derived Attachment-protein-mediated Cell Attachment". *J Dent Res*. Vol.79 No.10 (2000):1789-1793.
59. Metzger Z, *et al*, "Differential chemotactic effect of cementum attachment protein on periodontal cells". *J Periodontal Res*. Vol. 33 No.2 (1998):126-129.
60. Trujillo Nieva, M.R. & H. Arzate. "Expresión de la proteína de adherencia del cemento (CAP) con medios condicionantes de cementoblastos, osteoblastos y células del ligamento periodontal". *Division de Estudios de Posgrado e Investigación Año 6, No. 23-24 (2002):26-31*.
61. Barkana I. *et al*, "Cementum Attachment Protein Enriches Putative Cementoblastic Populations on Root Surfaces *in vitro*". *J Dent Res* Vol. 79 No.7 (2000):1482-1488.
62. Liu, HW *et al*, A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament". *J Bone Miner Res* Vol.12 (1997):1691-1699.
63. Olson, S. *et al*, "Cell Attachment Activity of Cementum Proteins and Mechanism of Endotoxin Inhibition". *Journal of Dental Research*. Vol.70 No.9 (1991):1272-1277.
64. Pitaru, S. *et al*, "Molecular and cellular interactions of a cementum attachment protein with periodontal cells and cementum matrix components". *J. Periodont. Res*. Vol. 28 (1993):560-562.
65. Sela J, Schwartz Z, Swain LD, Boyan BD, The role of matrix vesicles in calcification. En Bonucci E. *Calcification in biological systems*. Florida, USA CRC press 1992.
66. Whyte MP, Peck WA, Alkaline phosphatase: physiological role explored in hypophosphatasia. *Bone Min Res*. 1989; 6: 175-218.
67. Miao D, Scutt A, Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *The journal of histochemistry & cytochemistry*. 2002; 50: 333-340.
68. Groeneveld MC, Everts V, 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: 1374-81.
69. Bosshardt DD, Selvig KA, Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol* 2000. 1997; 13: 41-75.
70. Somerman MJ, Shroff B, Argraves WS, Morrison G, Craig AM, Denhardt DT, *et al*, Expression of Attachment proteins during Cementogenesis. *J Biol Buccale*. 1990; 18: 207-214.
71. MacNeil RL, Sheng N, Strayhorn C, Fisher LW, Somerman MJ, Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis. *J Bone Miner Res*. 1994; 9: 1597-1606.
72. Hammarström L, Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*. 1997; 24: 669-677.
73. Hammarström L, Heijl L, Gestrelius S, Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 669-677.
74. Hammarström L. (a) The role of enamel matrix proteins in the development of cementum and periodontal tissues. *Ciba Foun Symp*. 1997; 205: 246-255.
75. Hammarström L. (b) Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*. 1997; 24: 658-668.
76. Hammarström L, Alati I, Fong CD, Origins of cementum. *Oral Diseases*. 1996; 2: 63-69.
77. Sire JY, Delgado S, Fromentin D, Girondot M, Amelogenin: lessons from evolution, *Archives of Oral Biology*. 2004; 50: 205-212.
78. Lyngstadaas SP, Wohlfahrt JC, Brookes SJ, Paine ML, Snead ML, Reseland JE, Enamel matrix proteins; old molecules for new applications, *Orthod Craniofac Res* 2009; 12: 243-253.
79. Zeichner-David Margarita, Is there more to enamel matrix proteins than biomineralization? *Matrix Biol*. 2001; 20: 307-316.
80. Paine ML, Snead ML, Tooth developmental biology: disruptions to enamel-matrix assembly and its impact on biomineralization. *Orthod Craniofacial Res*. 2005; 8: 239-251.
81. Bosshardt DD, Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol*. 2008; 35: 87-105.
82. Behrens P, Bäuerlein E. Handbook of biomineralization: Biomimetic and bioinspired chemistry. Wiley-VCH 2007.
83. Kawasaki K, Buchanan AV, Weiss KM. Biomineralization in humans: making the hard choices in life. *Annu Rev Genet*. 2009;43:119-42.
84. Golub EE. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Dec;1790(12):1592-8. Epub 2009 Sep 26.
85. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J*. 1996 Jul 1;317 (Pt 1):59-64.
86. Wang L, Nancollas GH. Pathways to biomineralization and biodegradation of calcium phosphates: the thermodynamic and kinetic controls. *Dalton Trans*. 2009 Apr 21;(15):2665-72. Epub 2009 Feb 7.

87. Weiner S. Biomineralization: a structural perspective. *J Struct Biol.* 2008 Sep;163(3):229-34. Epub 2008 Mar 7.
88. García-Ruiz JM. Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Methods Enzymol.* 2003;368:130-54.
89. Ghildiyal Megha and Zamore Phillip D. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature.* 2009;10; 94-108.
90. Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet.* 2001; 2:110-119.
91. Karagiannis TC, El-Osta A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. *Cancer Gene Ther.* 2005; 10:787-95.
92. Mello CC, Conte D Jr. Revealing the World of RNA interference. *Nature.* 2004 Sep 16;431:338-342.
93. López T, Silva D, López S, Arias C. RNA de interferencia: el silencio de los genes. *Biotecnología;* 14: 110-117. 2007.
94. Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S, A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue forming cell lineage of the periodontal ligament. *J Bone Miner Res.* 1997; 12: 1691-1699.
95. Van den Bos, T. y W. Beertsen. "Alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament: age effect and relation to cementum growth rate". *J Periodont Res Vol.* 34 (1999):1-6.
96. Chen J, Shapiro HS, Wrana JL, Reimers S, Heersche JNM, Sodek J (1991a) Localization of bone sialoprotein (BSP) expresión to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization. *Matrix* 11: 133-143.
97. Chen J, Zhang Q, McCulloch CAG, Sodek J (1991b) Immunohistochemical localization of bone sialoprotein in fetal porcine tissues: comparison with secreted phosphoprotein 1 (SSP-1, osteopontin) and SPARC (osteocalcin). *Histochem J* 23: 281-289.
98. Kunimatsu R, Tanimoto K, Tanne Y, Kamiya T, Ohkuma S, Huang YC, Yoshimi Y, Miyauchi M, Takata T, Tanne K. Amelogenin enhances the proliferation of cementoblast lineage cells. *J Periodontol.* 2011, 11: 1632-1638.
99. Viswanathan HL, Berry JE, Foster BL, Gibson CW, Li Y, Kulkarni AB, Snead ML, Somerman MJ. Amelogenin: a potential regulator of cementum-associated genes. *J Periodontol.* 2003, 10: 1423-1431.
100. Hakki SS, Berry JE, Somerman MJ. The effect of enamel matrix protein derivative on follicle cells in vitro. *J Periodontol.* 2001; 5: 679-687.
101. Mizuno N, Shiba H, Mouri Y, Xu W, Kudoh S, Kawaguchi H, Kurihara H. Characterization of epithelial cells derived from periodontal ligament by gene expression patterns of bone-related and enamel proteins. *Cell Biol Int.* 2005; 29: 111-117.
102. Li X, Shu R, Liu D, Jiang S. Different effects of 25-kDa amelogenin on the proliferation, attachment and migration of various periodontal cells. *J Dent Res.* 2010; 89: 165169.