



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“ESTUDIO DE CRISTALES INDUCIDOS CON EL PÉPTIDO DE LA
PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR (CAP) EN
UN SISTEMA LIBRE DE CÉLULAS”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. EN C. GONZALO MONTOYA AYALA

TUTORES

DR. HIGINIO ARZATE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UNAM

DR. J. JESÚS ARENAS ALATORRE

INSTITUTO DE FÍSICA UNAM

MÉXICO, D.F. ABRIL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| ANTECEDENTES | 5 |
| Biom mineralización | 5 |
| Interacciones Proteína-Mineral | 7 |
| Funciones de las proteínas en la biom mineralización | 8 |
| Modulación de la formación de cristales por proteínas | 9 |
| Péptidos naturales funcionales | 11 |
| Cemento radicular | 12 |
| Proteína de Adhesión al Cemento Radicular (CAP) | 14 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN | 16 |
| HIPÓTESIS | 16 |
| OBJETIVOS | 17 |
| DESARROLLO EXPERIMENTAL | 18 |
| RESULTADOS | 24 |
| DISCUSIÓN | 33 |
| CONCLUSIÓN | 38 |
| BIBLIOGRAFÍA | 39 |



RESUMEN

El proceso de biomineralización ocurre en diversos sistemas biológicos, en donde la formación y organización está altamente regulada. En los vertebrados, los cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ constituyen la fase mineral, la cual se deposita en la matriz orgánica, por lo que ha sido uno de los biominerales más estudiados. 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. El cemento radicular posee dos proteínas, que hasta el momento son específicas, la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento (CAP). CAP 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 *in vitro* e *in vivo*. Tiene una alta afinidad por la hidroxiapatita y participa en el proceso de mineralización de cementoblastos humanos *in vitro*.

Objetivos. Determinar *in vitro* la actividad biológica de un péptido de CAP durante la formación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita.

Metodología. Se emplearon dos técnicas generales de experimentación, una a partir de ensayos con gel de metasilicato para visualizar la formación de cristales en un sistema libre de células y su posterior evaluación con distintas técnicas de microscopía electrónica. La segunda técnica, se basa en el estudio del crecimiento cristalino a partir de “cristales-semillas” de Hidroxiapatita para evaluar el papel del péptido sobre el crecimiento de estos cristales.

Resultados. Las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido, Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución, Microscopía de Fuerza Atómica y de microRaman demostraron que el péptido de CAP está asociado a la formación y composición de cristales de hidroxiapatita, *in vitro*.

Conclusión. Nuestros resultados sugieren que el péptido de CAP juega un papel importante durante el proceso de mineralización.



ABSTRACT

Biom mineralization is a process that occurs in different biological systems, where the nucleation and growth are highly regulated. In vertebrates, the mineral phase (crystals of hydroxyapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$) is deposited in the organic matrix. Hydroxyapatite has been one of the most studied biom minerals. Nucleation of hydroxyapatite crystals only occurs if there are source of calcium and phosphate ions, and involving one or more biomolecules. The cementum has two proteins which so far are specific, cementum protein 1 (CEMP1) and cementum attachment protein (CAP). CAP has been localized in the matrix of cementum and cementoblasts in vitro and in vivo. This protein possesses high affinity for hydroxyapatite and participates in the mineralization process, of human cementoblasts in vitro.

Objectives. Determine, in vitro, the biological activity of a peptide CAP during formation and crystal growth of hydroxyapatite.

Methodology. In this study, we used two experimental techniques: 1. Metasilicate gels to visualize the formation of crystals in a free cell system by using different electron microscopy techniques. The second technique is based on the study of crystal growth from hydroxyapatite “seed-crystals” to evaluate the role of the peptide in the growth process.

Results. The images obtained with Scanning Electron Microscopy (SEM), High Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM), Atomic Force Microscopy (AFM) and microRaman, showed that the CAP-derived peptide is strongly associated with the formation and composition of hydroxyapatite crystals in vitro.

Conclusion. Our results suggest that the CAP-derived peptide plays an important role in the mineralization process.



ANTECEDENTES

Biom mineralización

La biom mineralización se refiere al proceso mediante el cual los organismos vivos producen minerales (1,2). Específicamente, el término biom mineral se ha acuñado a los minerales producidos bajo condiciones estrictamente controladas a través de componentes tanto minerales como orgánicos en sistemas biológicos. Dichos biom minerales poseen características como tamaño, forma y cristalinidad que son distintas de sus equivalentes abióticamente formados. Esta notable capacidad está codificada en los genomas de organismos biom mineralizantes, que son capaces de producir biomoléculas que inducen la nucleación de minerales polimorfos específicos y además controlan su crecimiento (1). Los primeros estudios sobre biom mineralización revelaron dos mecanismos distintos a través del cual los organismos precipitan sales minerales. Estos son conocidos como biom mineralización biológicamente inducida y biológicamente controlado (3,4). En la biom mineralización biológicamente inducida, los organismos controlan la composición de la solución para favorecer así la precipitación de la fase mineral. Este control indirecto da como resultado una regulación baja sobre el tipo de mineral precipitado (3,5,6). Esta falta de control ha sido superada por los organismos que utilizan la biom mineralización biológicamente controlada. En este proceso los organismos dirigen la formación y ubicación de biom minerales usando moléculas biológicas específicas adaptadas para controlar la nucleación, el crecimiento y la morfología de los cristales (4,7,8). Estos también pueden utilizar sistemas de transporte celular, si es necesario, para depositar el material precipitado en su ubicación final.



La formación de tejidos mineralizados se produce en casi todos los grupos de organismos, desde procariotas (nanocristales de magnetita en ciertas bacterias) hasta los seres humanos (hueso y órganos dentarios). El inicio de la mineralización tiene lugar en vesículas de la matriz intracelular de las células formadoras del tejido mineralizado (osteoblastos en el caso de hueso), en donde los iones de fosfato de calcio son acumulados. Las concentraciones de fosfatos de calcio eventualmente precipitan y forman cristales de hidroxiapatita. Más tarde, los cristales atraviesan la membrana de las vesículas para dar lugar a los nódulos de calcio en el medio extracelular. Los cristales minerales maduran dentro del andamio proporcionado por las fibras de colágena. El grado de madurez de los cristales depende de las condiciones extracelulares como la concentración de los iones de fosfato de calcio, pH, y la presencia de proteoglicanos y proteínas no colagénicas de la matriz extracelular (9,10,11). Las proteínas de la matriz extracelular pueden actuar como nucleadoras, inhibidoras, moléculas de anclaje o andamios para el depósito del mineral. Numerosos estudios, con diferentes sistemas experimentales han intentado determinar el efecto de proteínas de tejidos minerales en la formación de cristales de hidroxiapatita *in vitro* (12,14). Se ha demostrado, por ejemplo, que la Osteopontina (OPN) es un inhibidor de la formación de cristales de hidroxiapatita; mientras que la macromolécula ósea (BSP) es un potente nucleador de hidroxiapatita en un sistema de gel de agarosa (15). La capacidad de estas proteínas para inducir y/o inhibir la mineralización se atribuye a menudo ya sea sus regiones poli-ácido [poli-glutamato (poli-Glu) o poli-aspartato (poli-Asp)] o a sus numerosos residuos de fosfoserina (17, 18). Las proteínas ácidas que participan en cada uno de estos procesos de cristalización se cree, pese a su desorganizada estructura secundaria, proporcionan una plantilla capaz de dirigir la formación *de novo* de fases minerales específicas (10). Por tanto, el papel que juegan las moléculas en la matriz mineralizante dependerá de las interacciones con los iones calcio del medio durante el crecimiento de la hidroxiapatita, así como también las interacciones con otras moléculas.



Interacciones Proteína-Mineral

Un cristal es un cuerpo sólido que posee una disposición de repetición regular de moléculas consistentes, átomos o iones (20). Nucleación es el evento inicial durante la precipitación de un cristal inorgánico a partir de los iones disueltos. El proceso se produce a través de la agregación de iones en fase, desde soluciones individuales para formar un grupo pequeño, conocido como núcleo. La estabilidad de un núcleo depende de su tamaño, que a su vez es dependiente del nivel de sobresaturación de la solución (21); núcleos más grandes que el radio crítico tienden a un crecimiento más grande, mientras que aquellos por debajo del límite inferior del radio crítico tienden a disolverse. La formación de un núcleo en una solución pura se conoce como nucleación homogénea. En contraste, los organismos facilitan la biomineralización, a través de nucleación heterogénea, en núcleos pre-existentes o semillas de cristales (el núcleo recién formado tiene una composición similar pero diferente al resto) (20). Esto ocurre debido a la presencia de impurezas y otras moléculas orgánicas en solución, lo que reduce la barrera de energía libre.

Después de la formación de un núcleo, la tasa de crecimiento es dependiente de la velocidad de transporte, o difusión, de iones de la red a la superficie del cristal. El crecimiento de un cristal en una solución sobresaturada se produce debido a que el flujo de los constituyentes iónicos unidos a la superficie del cristal supera el flujo de estos constituyentes que salen de la superficie (22). Hay dos maneras para que se logre el crecimiento del cristal. El primer método implica el crecimiento de un núcleo de 2 dimensiones en una superficie pre-existente, que, aunque más favorable que la creación de un núcleo 3-dimencional, el crecimiento es menos que el producido en soluciones altamente supersaturadas (23). Generalmente, el crecimiento cristalino se da en arreglos de espiral que se crean en las dislocaciones de la red cristalina (roturas en la red cristalina), conocidos como dislocaciones de tornillo o montículos de crecimiento (24).



Al crecer en forma de espiral, proporcionan una fuente perpetua de láminas de crecimiento. Los animales pueden usar uno o las dos estrategias para promover la nucleación de los minerales inorgánicos. La primera se logra aumentando el nivel de sobresaturación de iones primarios en una solución (28,29).

El segundo implica el uso de macromoléculas biológicas, tales como proteínas o polisacáridos, como plantillas que imitan la red cristalina de una cara cristalina particular, compensando así la entropía desfavorable asociado con la transición de fase de solución sólida (30,31). La biomineralización implica un minucioso control de la nucleación, del crecimiento y de la morfología por los organismos vivos (26).

Funciones de las proteínas en la biomineralización

La incorporación de componentes orgánicos durante el crecimiento de los cristales contrarresta la fragilidad (falta de resistencia) que por lo general acompaña a la rigidez cristalina. Estos materiales, compuestos biogénicos, tienen propiedades muy diferentes de las de los cristales puros (27). Mientras que el cristal compuesto de biominerales proporciona rigidez; el agua y los componentes orgánicos (proteínas y carbohidratos) brindan resistencia a cargas de impacto y de la grieta de alargamiento (27). Por otra parte, los organismos son capaces de modular la rigidez de biominerales para adaptarse a funciones particulares, por ejemplo, la flexibilidad de huesos está relacionada con la proporción de agua y material orgánico que abarcan aproximadamente iguales masas de agua/materia orgánica y mineral (27). El calcio es el componente catiónico predominante que se encuentra en la mayoría de biominerales, algunos de los cuales incluyen hidroxapatita (HAP), oxalato de calcio (CaOx) y carbonato de calcio (como aragonito o calcita) (30). Los tipos más comunes de macromoléculas biológicas capaces de modular el crecimiento de cristales son polisacáridos ácidos y proteínas de la matriz extracelular (MEC) (30).



Se cree que las proteínas de la matriz extracelular (MEC), altamente ácidas, controlan la precipitación y el crecimiento de minerales en el esqueleto de los vertebrados. En los órganos dentarios, la fosfoproteína dentinaria (DPP) y la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1) han demostrado que dirigen la nucleación y el crecimiento de HAP in vitro (15,33,34). Del mismo modo, BSP, una proteína específica de tejido mineralizado de unión a colágena (35,36), es nucleadora de HAP en el hueso (9,15). Además de sus propiedades nucleadoras in vitro, BSP se ha encontrado en focos de pre-biomineralización in vivo (37).

Modulación de la formación de cristales por proteínas

Las proteínas con residuos neutros o cargados positivamente generalmente presentan una baja afinidad a la superficie de los cristales de HAP (38). Se ha observado que las proteínas salivales con capacidad de adsorberse a la superficie de los dientes (alta afinidad a HAP) poseen residuos negativos en regiones específicas de la molécula. Dentro de los sistemas biológicos, las moléculas orgánicas capaces de modificar la cristalización inorgánica son una clase de proteínas poli-aniónicas. Estas proteínas poseen proporciones relativamente altas de ácido aspártico, ácido glutámico, serina y residuos fosforilados. Recientemente, se han vuelto comunes los estudios basados en péptidos, derivados de proteínas moduladoras del crecimiento de cristales, en un esfuerzo para aclarar aún más los requisitos específicos y el proceso de la interacción entre las moléculas orgánicas y minerales (1).



Se sabe que residuos Poli-Glu permiten que las macromoléculas se adsorban de forma inespecífica a las caras de los cristales; posiblemente debido a características estructurales, porque a pH fisiológico poli-Asp es desordenado, mientras que poli-Glu persiste como una hélice extendida (40,41). Curiosamente, ambas moléculas, cuando se inmovilizan/adsorben a las superficies de germanio, actúan como nucleadores HAP (42), y se ha observado que los grupos ácidos de OPN juegan un papel importante en la unión a minerales durante la inhibición del crecimiento de cristales (19). Adicionalmente, se ha visto que la fosforilación post-traducciona participa en la regulación de la biomineralización, ya que, altera las propiedades inhibitorias de varias proteínas (16,17,39,43,44). Estudios recientes con péptidos, diferencialmente fosforilados, derivados de OPN han mostrado adsorción preferente por alguna cara específica de los cristales de oxalato de calcio (CaOx); lo cual sugiere que las macromoléculas fosforiladas se adsorben a través de interacciones electrostáticas no específicas entre los grupos fosfato y iones Ca^{2+} (45,46). La combinación de residuos ácidos y la fosforilación post-traducciona en la adsorción biomineral indican que la carga negativa es imprescindible para la capacidad de estas proteínas para llevar a cabo su función.

La agrupación de estas cargas negativas sugiere que la alta afinidad de estas proteínas ricas en ácido aspártico hacia minerales ricos en calcio, se deriva de su capacidad para interactuar electrostáticamente con iones de calcio. La adsorción de estas moléculas acídicas de la matriz extracelular en ciertas caras de un cristal, podrían bloquear la adición de más iones a esa superficie influyendo en el tamaño y crecimiento del cristal.



Péptidos naturales funcionales

Las proteínas y péptidos juegan un papel crítico en los procesos biológicos y fisiológicos en todos los organismos vivos. Los péptidos son pequeñas secuencias de aminoácidos, que a diferencia de las proteínas, no poseen estructura tridimensional, pueden cumplir funciones como estimular, regular o inhibir numerosas funciones biológicas; pueden actuar como transmisores de información y coordinar distintas actividades en varios tejidos. Se han encontrado presentes en células o en fluidos del cuerpo en cantidades pequeñas, por lo cual, se consideran como posibles agentes terapéuticos. Pueden sintetizarse químicamente a grandes cantidades, y el costo es mucho menor al compararlos con proteínas. Los péptidos han estado a la vanguardia de la investigación científica de las últimas décadas. Su diversidad estructural y alto nivel de selectividad, los posicionan como principales candidatos para desarrollo terapéutico. Para este fin, es deseable ser capaz de sintetizar péptidos bajo condiciones de laboratorio controladas utilizando reacciones químicas altamente eficientes. El campo de estudio de la síntesis química de péptidos se hizo factible por el desarrollo de la técnica de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS) en 1960 por Bruce Merrifield, por el que fue galardonado con el Premio Nobel de Química en 1984. Además de hacer la síntesis de péptidos práctica, esta técnica permite la introducción de aminoácidos no nativos y modificaciones post-traduccionales (PTMs) de manera regulada. A medida que el uso terapéutico de proteínas nativas o recombinantes para la re-mineralización aun no es viable, la investigación se ha centrado en el desarrollo de compuestos peptídicos miméticos o a la identificación de dominios funcionales dentro de proteínas de origen natural. Los péptidos naturales son en su mayoría fragmentos de proteínas del tejido óseo que se sabe que están implicados en la mediación de la formación de hidroxapatita.



La secuencia de aminoácidos en estas proteínas es capaz de unirse a dicho mineral y hace una plantilla para la integración estructural de matrices orgánicas e inorgánicas.

Proteínas no colágenas involucradas en la biomineralización son ricas en aminoácidos con residuos ácidos que tienen la capacidad de unirse con iones metálicos e inician el proceso de mineralización. Por ejemplo, los péptidos de unión a calcio derivados de DMP1 afectan a la nucleación *in vitro* de hidroxiapatita, y la región rica en ácido glutámico de BSP, está involucrada en la nucleación de cristales. Aunque muchas investigaciones se han dedicado a la aplicación de péptidos relacionados con la mineralización, hay poca evidencia acerca del empleo de péptidos naturales.

Cemento radicular

Durante la última década, han surgido numerosas investigaciones enfocadas en los mecanismos y factores que controlan la formación del hueso y el periodonto, y con esto nuevas ideas de cómo regenerar los tejidos perdidos a consecuencia de patologías, lesiones o desordenes genéticos. Sin embargo, el origen embriológico del periodonto sigue siendo un enigma, pues ha sido objeto de especulación debido a que hay dos teorías sobre dos orígenes celulares distintos pero que de ninguna manera son excluyentes uno del otro. Un tejido dental *sui generis* y poco estudiado es el cemento radicular. Hablar sobre el origen del cemento radicular humano pone de manifiesto las particularidades de este tejido de soporte, el cemento radicular recibe las fibras provenientes del ligamento periodontal (fibras de Sharpey) y es considerado como un tejido fundamental para la terapia regenerativa periodontal. La hipótesis clásica de Paynter y Pudy (1958), propone que los cementoblastos son células descendientes del folículo dental que migran a la superficie radicular en desarrollo, donde se diferencian y secretan matriz mineralizante.



Esta propuesta encaja con la idea de un origen embrionario común de los tres poblaciones celulares del periodonto (cementoblastos, células del ligamento periodontal y osteoblastos alveolares) (58,59,60).

Una hipótesis alternativa surge en 1975, donde Slavkin y Boyde consideran al cemento radicular una contribución epitelial de las células de la vaina epitelial de Hertwig; los cementoblastos derivan de una transformación ecto-mesénquima de las células de la vaina radicular epitelial de Hertwig, las cuales después secretan la matriz del cemento radicular. La cementogénesis inicia con el depósito de matriz sobre la superficie dentinaria por células de la vaina radicular epitelial de Hertwig, las cuales se desintegran, migran y se organizan como células ectomesenquimales de la papila dental, y posteriormente se diferencian en cementoblastos. El destino de las células de la vaina radicular epitelial de Hertwig, también es controvertido, ya que tradicionalmente se propone que la vaina epitelial se desintegra dejando pequeños grupos de células epiteliales que sobreviven indefinidamente en el ligamento periodontal, denominados restos epiteliales de Malassez (53,56,57,60) Estudios recientes sugieren que las células epiteliales de la vaina radicular epitelial de Hertwig sufren transformación ectomesenquimal, para diferenciarse en fibroblastos y cementoblastos, los cuales secretan el cemento acelular y celular, respectivamente. Aun cuando continúan los avances en la descripción de la odontogénesis, el origen del cemento radicular sigue siendo objeto de debate.

Los cementoblastos y odontoblastos, así como sus respectivos tejidos han sido comparados a partir de sus células (moléculas reguladoras de su diferenciación), propiedades estructurales y funcionales. Sin embargo, el cemento radicular posee características únicas. El cemento radicular es un tejido conectivo especializado calcificado que cubre las superficies radiculares de los órganos dentarios, cuyas funciones son proveer el anclaje del diente en su alveolo, distribuir las fuerzas masticatorias, mantener el espacio del ligamento periodontal, así como de mantener una constante relación oclusal. La microscopía de luz y electrónica han permitido clasificar al cemento de acuerdo a la presencia o ausencia de células y el origen de las



fibras colágenas. El cemento radicular, además, posee características únicas, ya que tiene un recambio metabólico bajo, no presenta aporte sanguíneo directo, inervación, drenaje linfático y tampoco presenta espacios medulares como el hueso alveolar (51,56-58,60).

Proteína de Adhesión al Cemento Radicular CAP

El gen de la proteína de adhesión del cemento (CAP) se localiza en el cromosoma 10p13-p14. CAP fue la primera proteína aislada del cemento radicular, se ha determinado que participa en el reclutamiento y la diferenciación celular durante la formación de cemento (49-52,). Se expresa en células del folículo dental, promoviendo su adhesión y diferenciación (49,50,54,55). Además, las células periodontales crecidas en presencia de CAP son capaces de formar un tejido mineralizado, *in vitro* (49,50). Recientemente, se informó de la identificación de un ARNm obtenido de lisados de células de ligamento periodontal y células derivadas del cemento utilizando un anticuerpo específico para CAP (49,50,54,55). Este ARNm codifica un polipéptido de 140 aminoácidos (número de acceso Genbank: AAR22554.1; gi: 38503520). El análisis BLAST de la base de datos de proteínas NCBI reveló que el N-terminal de 125 aminoácidos de este ARNm es idéntica a una isoforma truncada de 3-hidroxiacil-CoA deshidratasa 1 / proteína tirosina-fosfatasa (prolina en lugar de arginina catalítica) 1 / PTPLa (GenBank número de acceso: AY455942.1; GI: 38503519); siendo los últimos 15 aminoácidos la diferencia entre ambas isoformas. Esta nueva molécula fue nombrada PTPLa / CAP, la cual se expresa en cementoblastos y algunas poblaciones de células del ligamento periodontal (precursores probablemente de cementoblastos) pero no se detecta en otros tejidos como la encía o el hueso (50,54). El estudio en un modelo de defecto de tamaño crítico, donde la calota no se regenera *per se* durante la vida experimental de los animales (50,54),



hrPTPLa / CAP mostró su potencial en la regeneración ósea craneofacial, probablemente por la inducción de la neovascularización y el posterior reclutamiento de Células Troncales Mesenquimales, ya que se ha demostrado que la proteína se expresa por células troncales paravasculares en el ligamento periodontal, las cuales son progenitores de los osteoblastos y cementoblastos (50,54,55).

Los cementoblastos son las células principales responsables de la formación de cemento. En análisis de hibridación *in situ* se demostró que la expresión de PTPLa/CAP coincide con la mineralización de cemento y se expresó constitutivamente en todo el proceso (50). Además, CAP nativa, así como la forma humana y recombinante (hrPTPLa/CAP) se unen fuertemente a la hidroxiapatita (50,54). Bajo el análisis de dicroísmo circular, la estructura secundaria de hrPTPLa/CAP se compone principalmente de estructura α -hélice y espiral aleatoria. El punto isoeléctrico teórico de hrPTPLa/CAP es 6,37. hrPTPLa/CAP forma estructuras proteicas casi esféricas en escala nanométrica (4.8 nm). Estas nanoesferas forman, a su vez, agregados organizados. Se ha demostrado que las proteínas intrínsecamente desordenadas son multifuncionales y pueden tener propiedades de unión a hidroxiapatita, como es el caso de SIBLING y HMGI (Y) (29, 30).

El mecanismo exacto a través del cual hrPTPLa/CAP regula este proceso no está completamente claro, sin embargo, se sabe que la estructura supramolecular en nanoesferas puede promover la deposición de fosfato de calcio mediante la concentración de cargas en la superficie hidrófoba, y por lo tanto, actúa como una plantilla de nucleación interactuando directamente con la hidroxiapatita (33). En este trabajo, empleamos un péptido derivado de la proteína PTPLa/CAP que podría ser un motivo funcional con la capacidad de interactuar con cristales de hidroxiapatita.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El proceso de biomineralización es considerado como un paradigma para el desarrollo de nuevas terapias para la regeneración de tejidos mineralizados perdidos por diversas patologías. Los mecanismos moleculares de la cristalización de los minerales biológicos no son claros, por lo que determinar la interacción de proteína-proteína y proteína-mineral de las macromoléculas durante la mineralización permitirá el desarrollo de nuevas terapias regenerativas.

HIPÓTESIS

El péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular induce la formación y regula el crecimiento de cristales de hidroxiapatita bajo un sistema de metasilicato en gel libre de células.



OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto inductor del péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAPp) en la formación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita, *in vitro*.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Identificar la concentración óptima de CAPp en la formación de cristales en soluciones supersaturadas.
- Caracterizar mediante diferentes técnicas de microscopía electrónica los cristales formados por inducción de CAPp en un sistema libre de células.
- Determinar el papel regulador de CAPp en un sistema de crecimiento constante a partir de una base de hidroxiapatita.



INTRODUCCIÓN EXPERIMENTAL

Síntesis del péptido de CAP

Se utilizó el péptido de CAP, el cual está conformado por 15 aminoácidos (VSFPSCCFSSIIVIFM); INVITROGEN. Se preparó el péptido a una concentración de 4 µg/mL en agua bi-destilada.

Ensayo de nucleación con Alizarina roja

Para estudiar el efecto del péptido sobre el crecimiento de hidroxapatita, se colocó en una placa de 96 pozos Nunc maxisorp 10 µL solución de fosfato (KH_2PO_4 10mM, Na_2HPO_4 20mM y NaCl 150mM) pH7.4; 80 µL de solución buffer (HEPES 50mM, NaCl 150mM, a pH4) con diferentes concentraciones del péptido (2.5,5,7.5,10,15 y 20 µg) y 10 µL de solución de Calcio (CaCl_2 50mM, HEPES 50mM, NaCl 150mM a pH4). Después de 4h de incubación a temperatura ambiente, se removió todo el líquido de cada pozo por pipeteo, dejando los cristales precipitados en el fondo de cada pozo durante toda la noche. Se agregaron 75 µL de solución de Alizarina Roja (0.5%, pH4.2) y se dejó teñir por 20 seg. La solución de Alizarina Roja se removió por pipeteo y posteriormente se agregaron 100 µL de solución de Cloruro de Cetilpirimidina, la cual se incubó durante 1h a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 570nm usando un espectrofotómetro.



Ensayo de mineralización en un sistema libre de células

Para determinar el papel inductor del péptido de CAP en la formación de cristales de hidroxiapatita se utilizó el sistema con geles de silicato, a una concentración de 1.06. Las concentraciones del péptido derivado de CAP se utilizaron a 100 µg, 200 µg y 500 µg. Como grupo control se empleó el mismo sistema sin proteína. Como solución de difusión se utilizó cloruro de calcio (JT Baker) a una concentración de 100mM preparado en amortiguador HEPES a una concentración de 10mM y pH final 7.4. Los geles se incubaron a 7, 14 y 30 días.

Los cristales de fosfato de calcio se cristalizaron por reacción química controlada entre los iones de fosfato y calcio en un medio semisólido (2 mL de Metasilicato de sodio 1.06 g/mL, 1.8 mL de amortiguador HEPES a una concentración de 10 mM y pH 7.4, 0.2 mL de amortiguador HEPES más azida de sodio 1% y 1.08 mL de H₃PO₄ 1 M) a pH y temperatura fisiológica. Se agregó el medio a un casete formado por dos vidrios de 7 cm x 9 cm x 3 mm, separados por un marco de neopreno de 3 mm de grosor y sellados con grasa para vacío. Se prepararon 5 mL del medio semisólido para cada casete; adicionando 20 µg de hrCAP por cada mL de la solución de gel de silicato, se utilizó un grupo control negativo con 20 µg de albúmina de suero bovino (BSA Sigma St. Louis, MO) por cada mL de la solución de gel y otro grupo control sin proteína. La solución de difusión empleada fue cloruro de calcio a una concentración de 100 mM preparado en amortiguador HEPES a una concentración de 10 mM y pH 7.4. Se incubaron durante 1, 3 y 7 días.



Recuperación de los cristales

Transcurridos los días de incubación, los cristales fueron separados del gel con ayuda de un microscopio estereoscópico (Stemi SV11 Carl Zeiss) y recolectados con MicroMounts de 150 μm (MiteGen Ithaca, NY). Los cristales se dividieron para tomar fotografías en microscopía electrónica de barrido (Jeol 5600LV) y análisis químico elemental utilizando espectroscopia por dispersión de energía de Rayos X (EDS), y microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (JEM2010FEG).

Caracterización de los cristales

La morfología y microestructura de los cristales de fosfato de calcio (con y sin proteína) fueron examinados usando un microscopio electrónico de barrido; la composición elemental se determinó por medio de una microsonda y se calculó la proporción Ca/P mediante el análisis de porcentajes atómicos de los elementos identificados en el espectro. La determinación de la fase cristalina se realizó con difracción de electrones en un microscopio electrónico de transmisión.



Síntesis de cristales de hidroxiapatita

Se utilizó la hidroxiapatita para el ensayo de crecimiento constante, la cual se sintetizó usando una modificación del protocolo descrito por Nancollas y Mohan (1970) (49). Se usaron 250 ml de 0,5 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, los cuales se añadieron gota a gota a una solución de 250 ml, de 0.3 M Na_2HPO_4 , que se mantuvo entre pH 8.5 y 10.0 mediante la adición de NH_4OH concentrado (28-30% solución) con agitación constante. La solución de Na_2HPO_4 también se mantuvo a 70°C mientras se burbujeó con nitrógeno saturado con agua.

El precipitado se lavó con H_2O destilada y luego se resuspendió en la “solución madre” y se sometió a reflujo durante 24 hrs. Los cristales se lavaron a continuación en un embudo de vidrio sinterizado a bajo vacío, primero con dH_2O pH10 y luego con acetona. Los cristales se secaron en un matraz Buchner con sellado al vacío y se almacenaron a temperatura ambiente en un desecador. Mediante difracción de rayos X de la HAP sintetizada se verificó la ausencia de otras fases de fosfato de calcio. Los espectros se recogieron en un microdifractómetro Bruker D8. Se realizaron mediciones de área de la superficie de HAP usando un Micrometrics ASAP 2010. Se empleó un analizador de área superficial BET para medir el volumen de gas nitrógeno adsorbido. 2 mg de HAP se disolvieron en 50 ml de solución de HCl 0.1 M y se dejó durante la noche antes del análisis ICP-AES.

La síntesis y caracterización de cristales de siembra se realizó por Heidi Liao en el laboratorio de biomineralización del Dr. G. Hunter del departamento de Bioquímica de la Universidad de Western Ontario, Canadá.



Ensayo de crecimiento por composición constante de HA

Se empleó una modificación del ensayo de crecimiento desarrollado originalmente por Nancollas y Koutsoukos (1978) (50). Se prepararon soluciones de fosfato de calcio metaestable 3.308 ml de dH_2O (menos el volumen del péptido), 1.733 ml de 1.2 mM de Na_2HPO_4 , 2.959 ml de 1 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/300$ mM de solución de NaCl, y el péptido (disuelto en dH_2O) en un vaso Pyrex de doble pared con agitación para reducir al mínimo las regiones de alta sobresaturación. La solución se mantuvo a $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ usando un sistema de "baño maria" de agua circulante conectado al vaso Pyrex.

Se empleó un electrodo pH4006 conectado a un gestor de titulación TIM900. El electrodo se calibró antes de cada experimento con soluciones tampón estándar de la IUPAC (pH 7.0 ± 0.01 y pH 10.0 ± 0.01) a 37°C . Para excluir dióxido de carbono atmosférico de la solución, se introdujo un tubo de flujo por burbujeo (18.3 mL/min) de nitrógeno saturado con agua. Para proporcionar tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio, el flujo de nitrógeno se inició una hora antes de la adición de cristales de siembra. Antes de la adición de cristales de siembra de HAP, el pH de la solución metaestable se ajustó entre 7.4 y 7.41 por la adición de pequeñas alícuotas de NaOH 25 mM. El electrodo de pH controla dos buretas (5 mL) operados en el modo de "maestro-esclavo". La bureta "maestro" contenía 3.5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/300$ mM de NaCl y la bureta 'esclavo' contenía 2.1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ 1.6 mM. La titulación se controló con un pH de punto final de 7.4 y el pH de la banda proporcional de 0.100. Las buretas se limitaron a una velocidad mínima de 1% / min y una velocidad máxima de 3.0% / min.



Se midieron las concentraciones de calcio y fósforo de todas las soluciones usando kits de ensayo colorimétrico (kit de ensayo de calcio Quanti-Chrom y ALS Pi ColorLock detección del agente Pi) comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, se calcularon las concentraciones exactas de las soluciones madre de acuerdo con los resultados de la prueba. Todas las soluciones fueron previamente filtradas al vacío a través de las membranas de polietersulfona con tamaño de poro 0.2µm

El gestor de titulación fue programado para mantener un pH de 7.4 por 240 minutos después del inicio de la reacción de crecimiento de los cristales. La reacción se inició mediante la adición de 450 µl de una suspensión de HAP recién hecha en dH₂O (2 mg HAP), dando una composición de la solución de reacción final de 0.5 mM de Ca(NO₃)₂, 0.3 mM Na₂HPO₄ y NaCl 150 mM (volumen total de 8 ml).

La tasa de crecimiento HAP se expresó como un porcentaje de crecimiento en comparación con la observada en ausencia del péptido.



RESULTADOS.

Se emplearon 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CAPp con el objetivo de observar el efecto de distintas concentraciones sobre el crecimiento de cristales de hidroxiapatita. Los resultados muestran que a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el péptido podría promover el crecimiento de los cristales. A bajas concentraciones, aparentemente podría actuar inhibiendo el crecimiento, sin embargo el mayor porcentaje de inhibición (~4%) se da con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

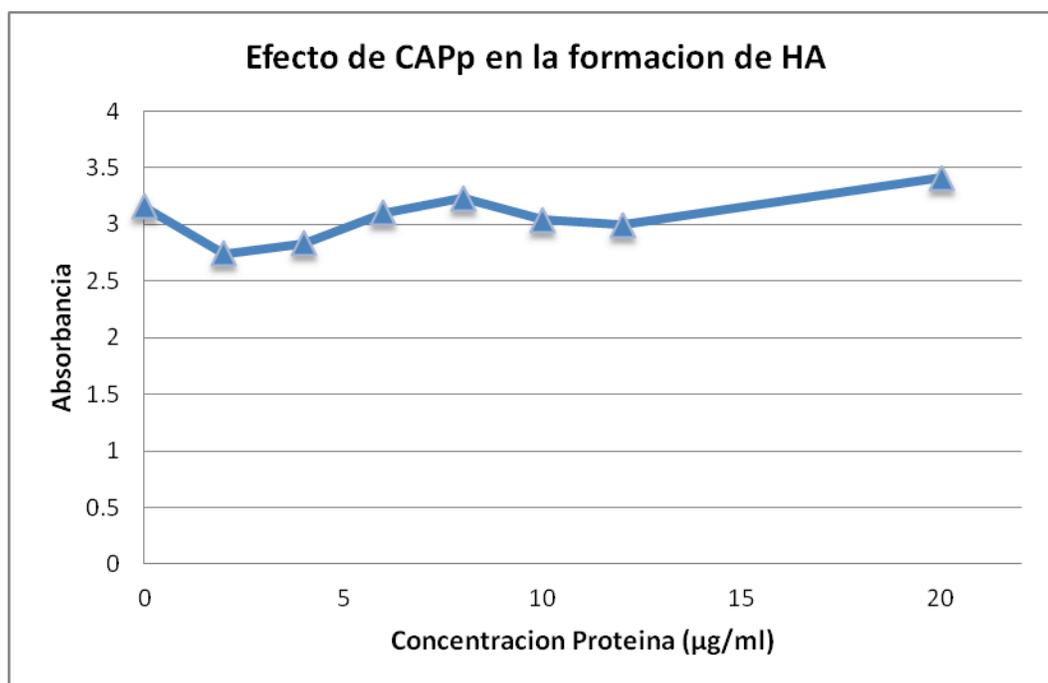


Figura 1. Efecto de diversas concentraciones del péptido de la Proteína de Adhesión del Cemento sobre el crecimiento de cristales de HA, mediante tinción con Alizarina Roja S.



Transcurrido el periodo de tiempo para el crecimiento de los cristales, estos se recuperaron manualmente del gel de silicato con MicroMounts de 150 μ m (MiTeGen Ithaca, NY). Parte de los cristales fueron almacenados en tubos Eppendorf de 1.5ml para su posterior procesamiento y análisis con microscopía electrónica de barrido. El resto de los cristales se recolectaron en tubos Eppendorf de 1.5ml para su análisis mediante microscopía electrónica de alta resolución y microscopía de fuerza atómica.

La morfología y microestructura de los cristales se examinaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) con distintos aumentos; las imágenes mostraron formaciones cristalinas laminares que crecen a partir de un núcleo agrupadas en esférulas. Al realizar acercamientos de las esférulas formadas, se observan cristales con crecimiento prismático muy ordenado bajo la influencia del péptido derivado de la Proteína de Adhesión del Cemento (Fig. 1).

El análisis de cristales formados sin la intervención de alguna macromolécula, se observó que los cristales muestran crecimientos laminares, dichos cristales se formaron por la precipitación de iones Calcio y Fosfato desde la fase móvil al gel de Silicato (Fig. 1).

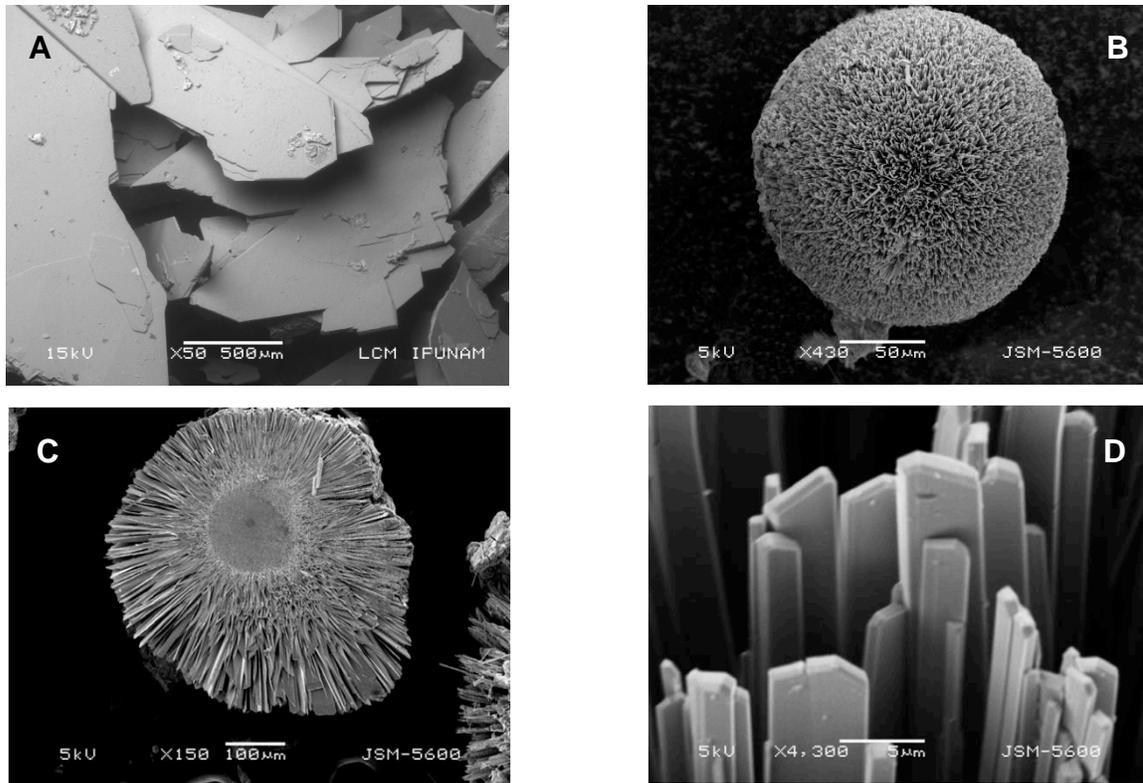


Fig.1 Imágenes de MEB: A) Muestra control donde se observan placas desorganizadas. B,C) imágenes de crecimiento cristalino formado en presencia del péptido de CAP después de 24hrs; la morfología de los cristales son en placas que se organizan en esférulas. El tamaño de las esférulas oscila alrededor de 200 μ m. D) Magnificación a 7,000 X donde se observa el crecimiento laminar



La composición elemental se determinó por medio de una microsonda por la técnica de Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS) para cada uno de los grupos empleados en este estudio. Los cristales formados en presencia del péptido de CAP muestran una fase cristalina cercana a la hidroxiapatita. Por otro lado, los cristales formados por simple precipitación están conformados en un rango de Calcio-Fosforo que corresponde a una fase mineral inmadura.

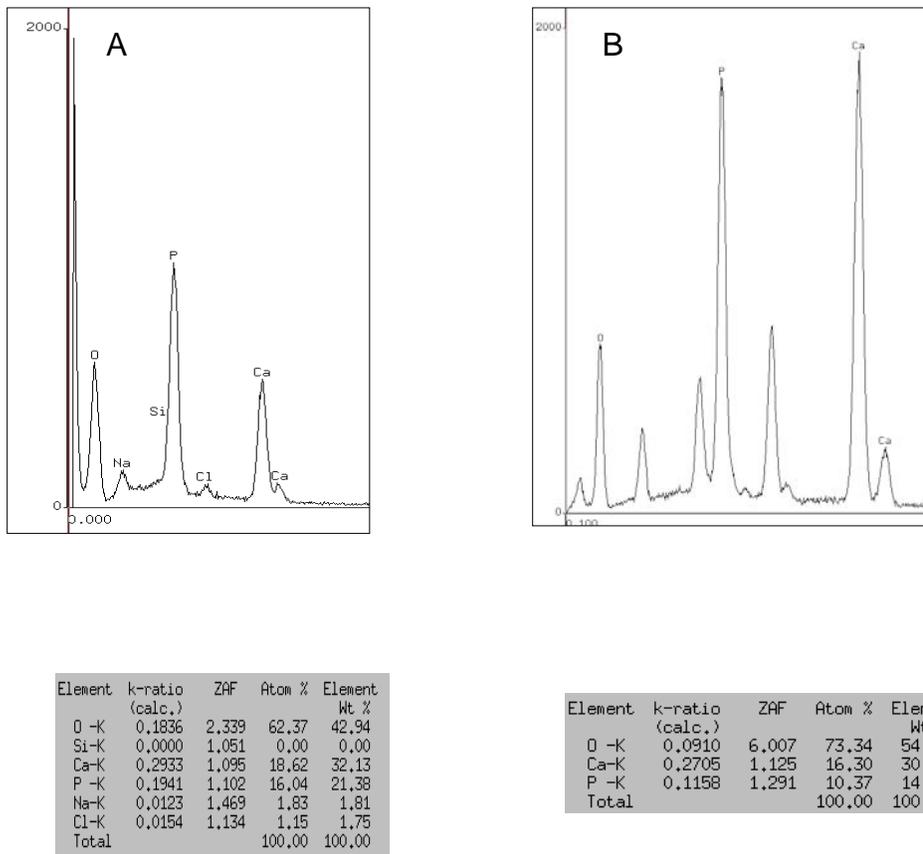


Fig.2 A) Composición química del control en donde se muestran los elementos propios del sistema de gel (Cl, Si, Na) y la cuantificación de Calcio y fósforo cuya relación es de 1.16. B) Las formaciones cristalinas en esférula indican una presencia mayoritaria de Calcio (Ca) y Fósforo (P), con una relación estequiométrica Ca/P del orden de 1.57



A partir de los valores obtenidos del análisis de EDS, se decidió analizar exhaustivamente los cristales formados con el péptido de CAP y con Microscopio Electrónico de Transmisión de Alta Resolución se determinó la resolución atómica y las reflexiones cristlinas que nos permiten identificar la fase mineral de los cristales, los valores obtenidos se compararon con tablas de Cristalografía Internacionales para verificar que se trata de Hidroxiapatita. Se obtuvieron las distancias interplanares A) 0.362nm, 0.294nm; b) 0.680nm, 0.340nm y mediante la transformada de Fourier dichas distancias corresponden a los planos cristalinos 112, 002; y 502, 211 respectivamente, las cuales corresponden a la fase mineral de Hidroxiapatita (de acuerdo a tablas de Cristalografía Internacionales JCPDS 44-078.2001)

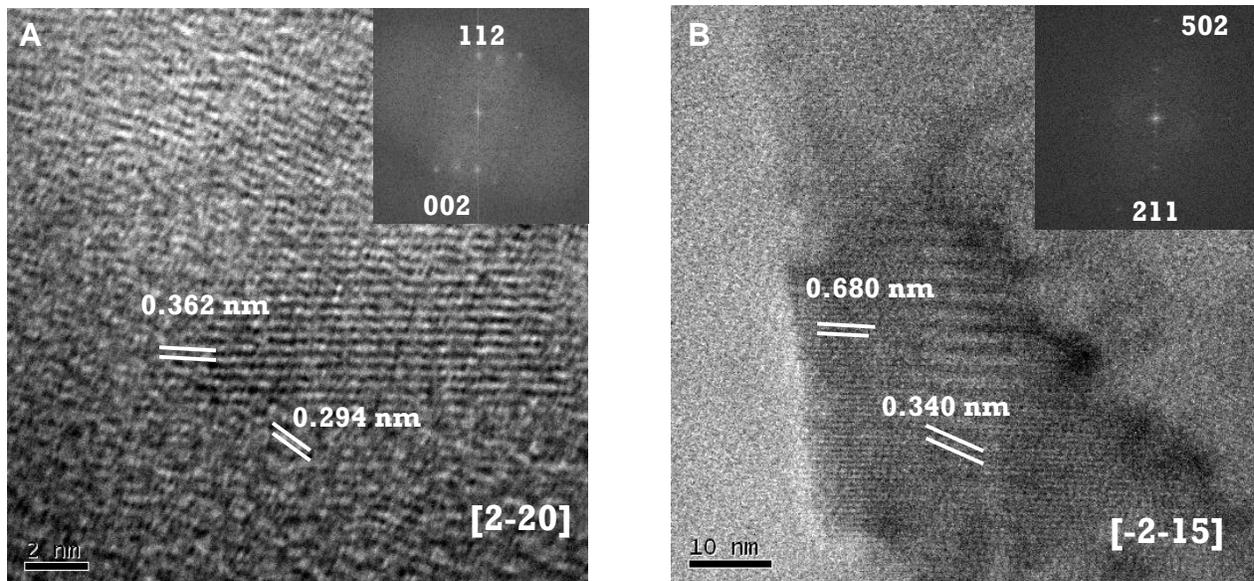


Fig.3 Imágenes de Alta resolución donde se muestran los planos cristalinos de los cristales inducidos con CAPp.



La topografía de la superficie de los cristales, se analizó mediante Microscopía de Fuerza Atómica. Las imágenes indican crecimiento unidireccional de los cristales de HAP con un espesor menor a una décima de micra, los cuales conforman una superficie irregular.

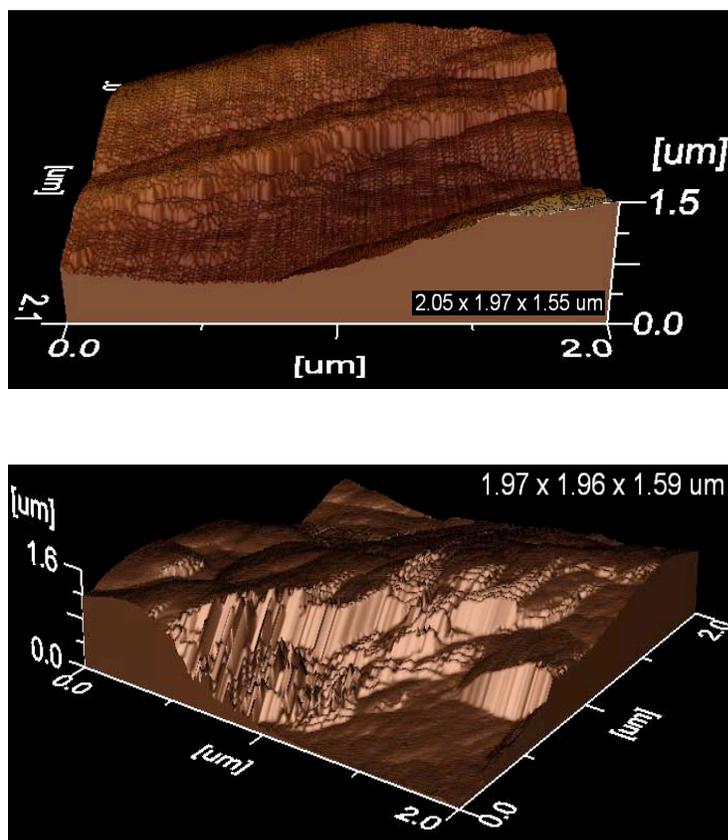


Fig.3 Imágenes tridimensionales de la topografía de los cristales obtenidos con el péptido de la Proteína de Adhesión del Cemento con $2\mu\text{m}^2$ de barrido



Para corroborar la fase mineral de los cristales formados por inducción del péptido de la Proteína de Adhesión del Cemento, se realizó un estudio de μ Raman para determinar la frecuencia de vibración del grupo PO_4^{3-} característico de la Hidroxiapatita. Las frecuencias obtenidas a 431 cm^{-1} , 593 cm^{-1} , 963 cm^{-1} y 1011 cm^{-1} corresponden a los cambios de energía inducidos por los iones PO_4^{3-} de la Hidroxiapatita.

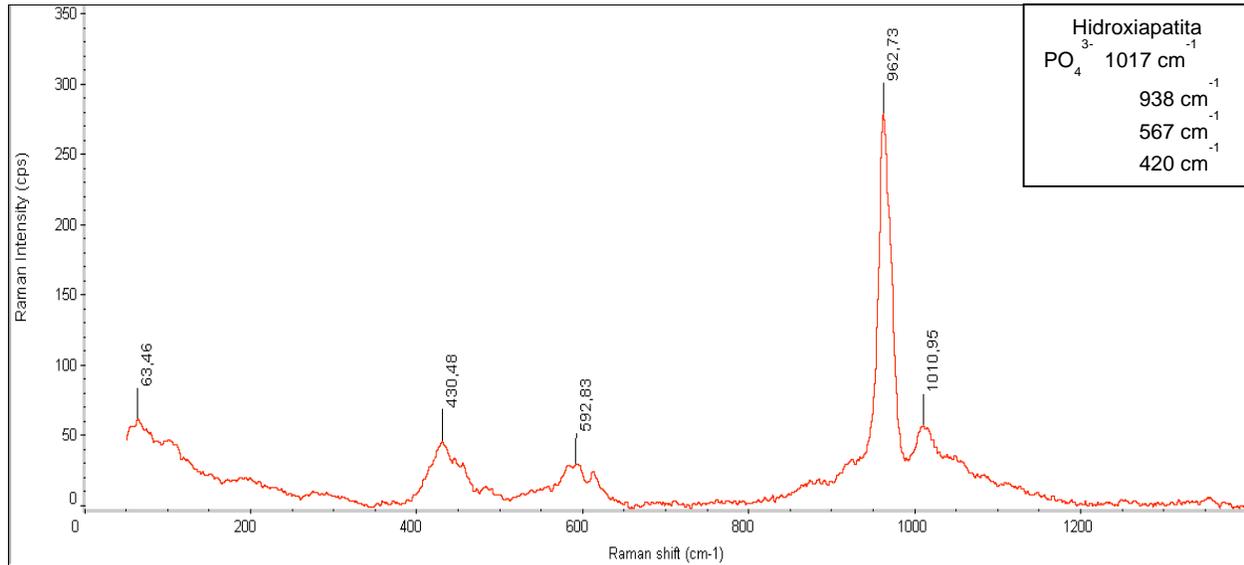


Fig.4 Espectro de μ Raman de los cristales inducido con el péptido de la Proteína de Adhesión del Cemento, que muestran las frecuencias de vibración del PO_4^{3-} , que corresponden a la Hidroxiapatita.



Una vez que se estableció que la concentración de 20 μg del péptido de CAP era capaz de inducir el crecimiento organizado de cristales de hidroxiapatita, se realizaron ensayos para determinar el efecto de concentraciones menores del péptido en el crecimiento cristalino.

El ensayo de crecimiento por composición constante implica el uso de un aparato de autotitulación en la que un electrodo de pH controla dos buretas (una de ellas contiene fosfato de sodio e hidróxido de sodio, y la otra bureta contiene nitrato de calcio y cloruro de sodio).

El crecimiento de HAP se compone de dos fases, una primera fase de crecimiento exponencial seguido por un período prolongado de crecimiento lineal. La tasa de crecimiento lineal se observó después de 60 min, donde la tasa de crecimiento es linealmente proporcional a la masa de HAP.

La relación lineal demuestra que la nucleación primaria no se produce durante el curso del experimento. Así, el consumo de calcio, fosfato e hidróxido de la solución se produce únicamente debido a la incorporación de estos iones en la creciente red cristalina de cristales de HAP.

Los experimentos se realizaron utilizando tanto una masa constante de 2 mg de HAP y concentraciones crecientes del péptido. Se observó que con concentraciones bajas de péptido de CAP (principalmente 2.5 y 5 μg), estas podrían actuar como un inhibidor en la formación de cristales, ya que el volumen final se redujo en un ~14% y ~23% respectivamente; sin embargo, a partir de concentraciones crecientes se observó un aumento constante donde a 20 μg se observó un incremento del ~11% en el crecimiento cristalino con respecto al control.

El grupo control corresponde al desarrollo del crecimiento de cristales de HAP sin estimulación, durante los 240 min.

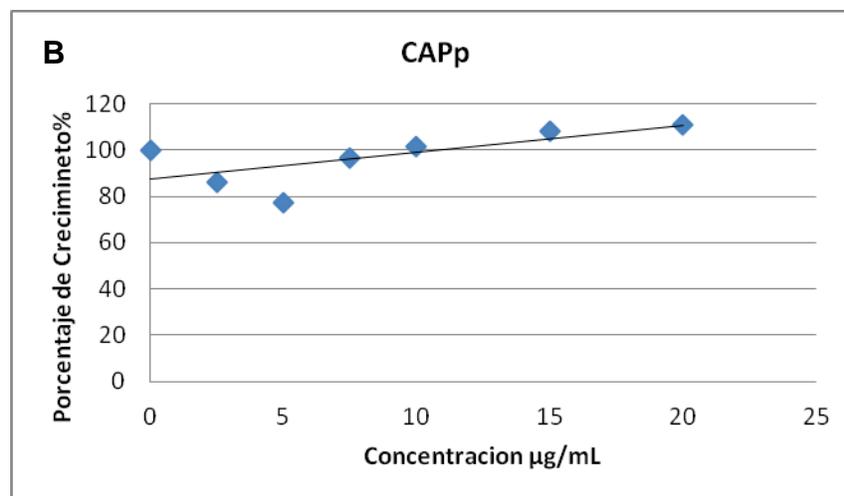
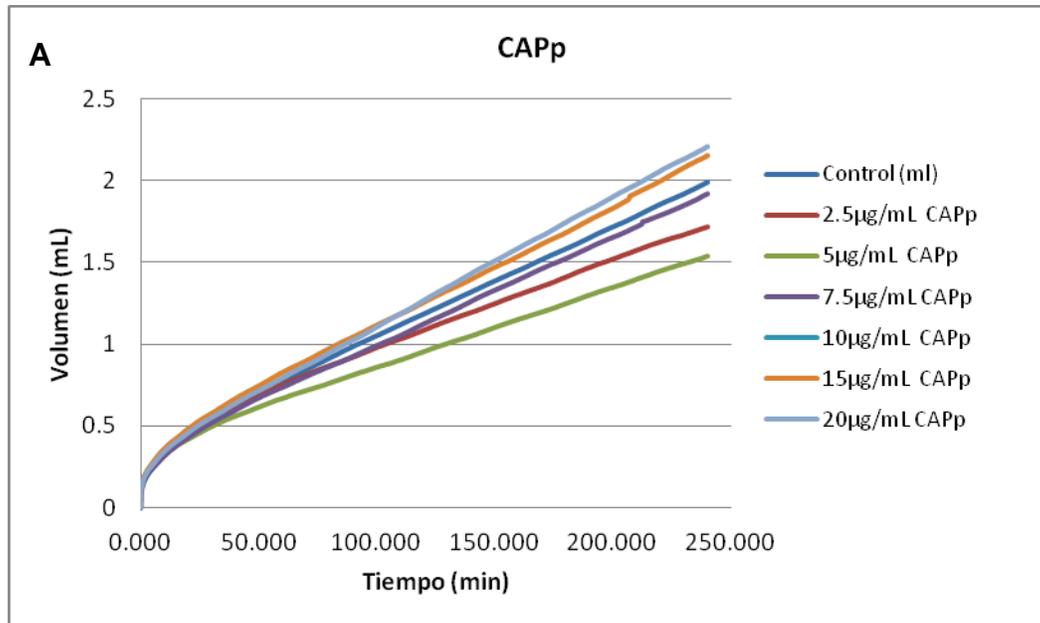


Figura 2. Efecto de distintas concentraciones del péptido de CAP sobre el crecimiento de cristales de HAP. En la grafica superior se observa el efecto del péptido sobre el volumen final de cada ensayo, que se ve reflejado en el crecimiento lineal de los cristales. La grafica inferior muestra la regresión lineal de los valores obtenidos.



DISCUSIÓN

Durante el proceso de Biomineralización, para que se de lugar a la nucleación y el crecimiento, se requiere la formación biomineral a partir de una fuente de sobresaturación suficiente. En la mayoría de los sistemas biológicos, el sitio de la deposición mineral está aislado del medio ambiente mediante una geometría de delimitación física. Las vesículas intracelulares crean compartimentos donde las composiciones se pueden regular con precisión. Este compartimento debe ser capaz de modificar la actividad de al menos un constituyente biomineral (por lo general el catión), así como los protones y, posiblemente, otros iones. Cualquier flujo de iones debe cumplir con una restricción: el fluido debe mantener la electroneutralidad. En tejidos mineralizados del cuerpo humano (hueso, cemento, dentina y esmalte) se ha demostrado que aunado a este proceso intracelular, la célula produce una matriz en un área que se convierte en el sitio de la mineralización. El término matriz se refiere a un grupo de macromoléculas compuestas de proteínas, polisacáridos o glicoproteínas que se ensamblan para formar una estructura tridimensional. De acuerdo a estudios de Veis y Perry en 1967; Weiner et al 1983, Swift y Wheeler 1992 la composición de la matriz es única, ya que muchas de sus proteínas contienen una alta proporción de aminoácidos ácidos (especialmente aspartato) y grupos fosforilados. La secreción de proteínas hidrófobas en el espacio extracelular podría proporcionar espacio para el depósito de minerales. Las estructuras y las composiciones de estos marcos orgánicos están programados genéticamente para llevar a cabo regulación esencial y/o la organización de las funciones que resultará en la formación de biominerales compuestos (2,3,4,14). 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 (28,68).

La teoría clásica supone que la nucleación y crecimiento cristalino de biominerales se da por la interacción de elementos esenciales (iones, moléculas) en soluciones sobresaturadas, aunque se pueden dar transformaciones de fases en etapas posteriores. La asociación de elementos en solución para la formación de precursores o unidades de crecimiento (clusters de Ca/P) es el primer paso importante. Estos pueden crecer por agregación y dar lugar a un macro-cristal termodinámicamente estable por transformaciones cristalinas amorfas. Esta teoría indica que los constituyentes pueden unirse en grupos de dos o más para formar dímeros o trímeros, por colisión. Por tanto, la nucleación es la aparición inicial de una nueva fase durante una transición de primer orden (poco estable) en el que los pequeños núcleos, formados espontáneamente en una solución sobresaturada, superan la barrera de nucleación. Se han realizado estudios donde la adición de proteínas (interactúan con iones Ca/P) promueven la nucleación de cristales de hidroxiapatita (10,14,20,26).

Existen distintas teorías acerca de la interacción de proteínas con caras específicas de cristales. La teoría estereoquímica requiere de la rigidez de la estructura β -laminar, β -hebra o α -hélice de las proteínas para formar enlaces con el Ca^{2+} presente en las caras del cristal. Estudios recientes han mostrado que las interacciones electrostáticas, donde la adsorción de proteínas a cristales se ve favorecida por grupos aniónicos presentes en péptidos o proteínas, no son una regla para todas las proteínas que interactúan de manera estereoquímica con la hidroxiapatita, ya que la falta de plegamiento de las proteínas de unión a minerales facilita su absorción al permitir que los grupos cargados tengan libertad conformacional para formar enlaces electrostáticos con iones Ca^{2+} expuestos en la cara del cristal (69,70,71).



Sin embargo, la interacción proteína-mineral es todavía más compleja. Características propias de las proteínas/péptidos como punto isoelectrico, presencia de grupos fosfato o carboxilato y la propia carga-neta de la secuencia de aminoácidos juegan un papel predominante en la interacción con minerales. Siempre se debe tomar en cuenta que los estudios *in vitro* son solo aproximaciones de lo que sucede en sistemas biológicos, ya que *in vivo* existen un gran número de variables (distintos iones, pequeñas moléculas, otras macromoléculas). Estudios bioinformáticos, han demostrado que existen dominios intrínsecamente desordenados y agregación propensos dentro del conjunto diverso de secuencias de proteínas de la matriz extracelular humanos (37). Estos dominios se cree que son responsables de la matriz de montaje observada y ordenamiento jerárquico de la matriz extracelular.

En este estudio se empleo un péptido de una proteína que se ha demostrado participar activamente en el proceso de biomineralización; se demostró que en un medio de sobresaturación, se formaron estructuras menos ordenadas y con crecimiento aleatorio en la ausencia de macromoléculas en comparación con aquellos cristales formados por la presencia del péptido. Las características fisicoquímicas de esta secuencia de 15 aminoácidos nos sugieren que se dan interacciones electrostáticas entre los grupos funcionales de los aminoácidos y los iones, para su eventual ordenamiento en el plano cristalino que da como resultado la formación de esférulas compuestas por pequeños cristales prismáticos muy ordenados que emergen de un núcleo formado por una fase menos madura a la hidroxiapatita

Los intentos de dilucidar los factores que afectan la precipitación de minerales biológicos han producido diversos ensayos con el objetivo de evaluar su tasa de crecimiento. Esto se realizaba inicialmente simplemente preparando soluciones sobresaturadas de fosfato de calcio y el análisis de la caída en la concentración de los iones respectivos en el tiempo (49). Estos métodos poseen estas desventajas: 1) la concentración de constituyentes minerales, tales como calcio y fosfato, disminuyen en el transcurso del experimento por lo que se reduce la fuerza motriz para la precipitación, y 2) debido a la disminución incesante en la concentración de iones



constituyentes, los experimentos tenían que empezar a nivel de sobresaturación con varias fases minerales estables distintas de Hidroxiapatita, incluyendo fosfato tricálcico $[\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2]$, fosfato de octacálcico $[\text{Ca}_8\text{H}_2 (\text{PO}_4)_{65}\text{H}_2\text{O}]$, fosfato dicálcico anhidro (CaHPO_4) , y dicálcico dihidrato de fosfato $(\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$. Estos problemas fueron resueltos con el desarrollo del método de crecimiento por composición constante, en el que se mantuvieron el pH y las concentraciones de calcio y fosfato a niveles constantes para la duración del experimento (50). Así pues, este nuevo método de activar la conducción de experimentos con concentraciones iniciales de fosfato de calcio en la que la HAP era la única fase mineral termodinámicamente favorable, de tal manera que los factores que afectan la tasa de mineralización de HAP en sobresaturaciones muy bajas pueden ser comprendidos (51). Cuando se combina con el uso de cristales de HAP bien caracterizados, esta técnica elimina la incertidumbre cinética de los ensayos de nucleación, lo que permite la elucidación de los efectos sobre la tasa de crecimiento de HAP de cualquier molécula en estudio. Además, se emplea un flujo constante de nitrógeno a través de la solución de reacción, el cual es esencial para lograr una tasa lineal de crecimiento de cristales. Si el flujo de nitrógeno no es constante, se disolverán cantidades variables de dióxido de carbono atmosférico en la solución de reacción, alterando la velocidad de adición de Calcio y Fosfato en respuesta al crecimiento cristalino.

La técnica se basa en el estudio del crecimiento cristalino a partir de “cristales-semillas” de HAP mediante la concentración constante en el sistema de Ca y P. Dichos experimentos revelaron que el crecimiento HAP se compone de dos fases distintas: una tasa de crecimiento rápida inicial que se redujo en el transcurso de los primeros 60 minutos, después de lo cual se observó una tasa de crecimiento lineal (que representa la cantidad de iones de calcio incorporado en los cristales en crecimiento) a partir de 1 hora hasta 4 h (52,53). La relación lineal observada entre la tasa de crecimiento de HAP y la masa de cristales de siembra utilizados indica que el péptido de CAP regula el crecimiento de HAP de manera proporcional a la concentración de la macromolécula.



Por lo tanto, el péptido no solo actúa como un nucleador, sino además es regulador del crecimiento de HAP.

La forma de un cristal refleja la naturaleza del entorno en el que crece. En la biología de este entorno, y por lo tanto, las formas de cristal, son en general muy bien controlados. Los análisis detallados de las formas de cristal y, en particular, las caras de cristal exactas expresadas pueden arrojar mucha luz sobre los mecanismos de crecimiento (Bouropoulos et al. 2001; Aizenberg et al. 1995). Sin duda, el avance de la tecnología ha permitido el entendimiento de procesos desde su nivel molecular hasta nivel atómico. En este trabajo se determinó que el péptido de CAP regula la morfología de los cristales inducidos desde el sistema de contradifusión en gel al observarse cristales prismáticos muy ordenadas que conforman esférulas; además, dichos prismas cristalinos corresponden a fases maduras de hidroxiapatita, que emergen de un núcleo constituido por una fase inmadura, indicando que el péptido interactúa con la organización de los iones en los distintos planos cristalinos. El proceso de cristalización de la hidroxiapatita aún no es claro y los mecanismos moleculares de la interacción de proteína-proteína y proteína-mineral son poco conocidos, por lo que descifrar dichas interacciones permitirá establecer estrategias promisorias en la regeneración de tejidos mineralizados.



CONCLUSIÓN

El péptido de la Proteína de Adhesión del Cemento a una concentración de 20 μg promueve la formación de cristales de hidroxiapatita; dicho péptido tiene la capacidad de regular la morfología y fase cristalina en un sistema libre de células, el cual se basa en la precipitación de una fase móvil desde soluciones supersaturadas de Calcio y Fosfato. La capacidad de controlar la organización de iones de Calcio y promover la formación de hidroxiapatita es dependiente de la concentración del péptido, ya que como se demostró en el ensayo de crecimiento por composición constante a concentraciones inferiores de 7.5 μg pareciera actuar como un inhibidor. Sin embargo, a concentraciones superiores promueve la formación prismática de cristales altamente ordenados. El mecanismo exacto de cómo el péptido de CAP favorece la agrupación de los iones para la formación cristalina de la Hidroxiapatita no es clara, pues el péptido es altamente hidrofóbico por lo que presumiblemente se den interacciones entre varias moléculas peptídicas y a su vez cada uno de los radicales de aminoácido establezcan interacciones interatómicas con los iones Calcio brindando la capacidad reguladora que se demuestra en este estudio. Hacen falta estudios moleculares más específicos para determinar la interacción precisa del péptido con los iones y las caras de los cristales.

En este trabajo se plantea el papel regulador de un péptido derivado de una proteína natural y biológicamente funcional, por lo que abre un panorama alentador en el entendimiento del proceso de biomineralización que dé lugar a nuevas terapias regenerativas en el área de la medicina y odontología.



BIBLIOGRAFIA

1. Azzopardi PV, O'Young J, Lajoie G, Karttunen M, Goldberg HA, Hunter GK. (2010) Roles of electrostatics and conformation in protein-crystal interactions. *PLoS One* 19;5(2)
2. Weiner, S. And Dove, PM (2003) An overview of biomineralization process and the problem of the vital effect. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry* 54, 1-29
3. Lowenstam HA (1981) Minerals formed by organism. *Science* 211, 1126-1131
4. Mann, S (1983) Mineralization in biological systems, *Struct. Bonding* 54, 125-174
5. Fortin D. (1997) Surface-mediated mineral development by bacteria. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry* 54
6. Tebo BM, Ghiorse WC van Wassbergen LG, Siering PL and Caspi R (1997) Bacterially mediated mineral formation: Insights into manganese (II) oxidation from molecular genetic and biochemical studies. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry* 35, 225-226
7. Wetherbee R (2002) Biomineralization. The diatom glasshouse. *Science* 298, 547
8. Addadi L, Joester D, Nudelman F and Weiner S (2006) Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization process. *Chemistry* 12, 980-987
9. Hunter GK and Goldberg HA (1993) Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8562-8565
10. Addadi L and Weiner S (1985) Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4110-4114
11. Gerbaud V, Pignol D, Loret E, Bertrand JA, Berland Y, Fontecilla-Camps JC Canselier JP, Gabas N and Verdier JM (2000) Mechanism of calcite crystal growth inhibition by the N-terminal undecapeptide of lithostathine. *J Biol Chem* 275, 1057-1064
12. Schlesinger DH, and Hay DI (1986) Complete covalent structure of a proline-rich phosphoprotein, PRP-2, an inhibitor of calcium phosphate crystal growth from human parotid saliva. *Int J Pept Protein Res* 27, 373-379
13. Lamkin MS, and Oppenheim FG (1993) Structural features of salivary function. *Crit Rev Oral Biol Med* 4, 251-259
14. Gorski JP (1992) Acidic phosphoproteins from bone matrix: a structural rationalization of their role in biomineralization. *Calcif Tissue Int* 50, 391-396
15. Hunter GK, Haushka PV, Poole AR, Rosenberg LC and Goldberg HA (1996) Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 317 (Pt1), 59-64
16. Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT and Prince CW (1993) Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner* 22, 147-159
17. Hunter GK, Kyle CL and Goldberg HA (1994) Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the Osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* 300(Pt3), 723-728



18. Tye CE, Rattray KR, Warner KJ, Gordon JA, Sodek J, Hunter GK and Goldberg HA (2003) Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. *J Biol Chem* 278, 7949-7955
19. Butler WT (2005) Structural and functional domains of Osteopontin. *Ann NY Acad Sci* 760, 6-11
20. De Yoreo JJ and Vekilov PG (2003) Principles of Crystal Nucleation and Growth. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry* 54, 57-93
21. Fletcher NH (1958) Size effect in heterogeneous nucleation. *The Journal of Chemical Physics* 3, 572-576
22. Chernov AA (1961) The spiral growth of crystals. *Physics-Usppekhi* 4, 116-148
23. Land TA, De Yoreo JJ and Lee JJ (1997) In situ AFM investigation of canavalin crystallization kinetics. *Surf Sci* 384, 136
24. Frank FC (1949) Influence of dislocations on crystal growth. *Discussions of the Faraday Society* 5, 48-54
25. Cabrera N and Vermileya DA (1959) Growth and perfection of crystals. John Wiley & Sons, New York
26. Williams RJP (1984) An introduction to Biominerals and role of organic molecules in their formation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 304, 411-424
27. Currey JD (1999) The design of mineralized hard tissues for their mechanical functions. *J Exp Biol* 202, 3285-3294
28. Thiele H and Awad A (1969) Nucleation and oriented crystallization apatite in ionotropic gels. *J Biomed Mater Res* 3, 431-441
29. Crenshaw MA and Ristedt H (1975) Histochemical and structural study of nautiloid septal nacre. *Biomineralization* 8,1-8
30. Lowenstam HA and Weiner S (1989) On biomineralization. Oxford University Press, USA
31. NudelmanF, Gotliv BA, Addadi L and Weiner S (2006) Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *J Struct Biol* 153, 176-187
32. Krause JW (2005) Krause's essential human histology for medical students, Universal-Publishers
33. He G, Dahl T, Veis A and George A (2003) Dentin matrix protein 1 initiates hydroxyapatite formation in vitro. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1, 240-245
34. He G, Dahl T, Veis A and George A (2003) Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat Mater* 2, 552-558
35. Kasugai S, Nagata T and Sodek J (1992) Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), Osteopontin (OPN) and SPARC protein during bone formation in vitro. *J Cell Physiol* 152, 467-477
36. Tye CE, Hunter GK and Goldberg HA (2005) Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction. *J Biol Chem* 280, 13487-13492



37. Wang A, Martin JA, Lembke LA and Midura RJ (2000) Reversible suppression of in vitro biomineralization by activation of protein kinase A. *J Biol Chem* 275, 11082-11091
38. Richardson CF, Johnsson M, Raj PA, Levine MJ and Nancollas GH (1993) The influence of Histatin-5 fragments on the mineralization of hydroxyapatite. *Archives of Oral Biology* 38, 997-1002
39. Wada T, McKee MD, Steitz S, and Giachelli CM (1999) calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by Osteopontin. *Circ Res* 84, 166-178
40. McDiarmid R and Doty P (1966) The spectrophotometric titration of polyacrylic, poly-L-aspartic, and poly-L-glutamic acid. *J Phys Chem* 70, 2620-2627
41. Goldberg HA and Hunter GK (1995) The inhibitory activity of Osteopontin on hydroxyapatite formation in vitro. *Ann NY Acad Sci* 760, 305-308
42. Tsortos A and Nancollas GH (2002) The role of polycarboxylic acids in calcium phosphate mineralization. *J Colloid Interface Sci* 250, 159-167
43. Fujisawa R, Kuboki Y and Sasaki S (1986) Changes in interaction of bovine dentin phosphophoryn with calcium and hydroxyapatite by chemical modifications. *Calcif Tissue Int* 39, 248-251
44. Romberg RW, Werness PG, Riggs BL, and Mann KG (1986) Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* 25, 1176-1180
45. Langdon A, Wignall GR, Rogers K, Sorensen ES, Denstedt J, Grohe B, Goldberg HA and Hunter GK (2009) Kinetics of calcium oxalate crystal growth in the presence of Osteopontin isoforms: an analysis by scanning confocal interference microscopy. *Calcif Tissue Int* 84, 240-248
46. Grohe B, O'youngJ, Ionescu DA Lajoie G, Rogers KA, Karttunen M, Goldberg HA and Hunter GK (2007) Control of calcium oxalate crystal growth by face-specific adsorption of an Osteopontin posphopeptide. *J Am Chem Soc* 129, 14946-14951
47. Moreno EC, Kresak M and Hay DI (1984) Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite. *Calcif Tissue Int* 36, 48-59
48. Goobes R, Goobes G, Campbell CT and Staytn PS (2006) Thermodynamics of statherin adsorption onto hydroxyapatite. *Biochemistry* 45, 5576-5586
49. Alvarez M, Narayanan S, Zeichner-David M, Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* 2006;38:409-419.
50. Valdés A, Hoz L, Arzate H, Rose T, Narayanan A S. Cementum Attachment Protein is Splice-variant of Protein Tyrosine Phosphatase-Like (Proline instead of catalytic Arginine (PTPLa)). *J Dent Res* 2012;91:203-209.
51. Nuñez J, Sanz-Blasco S, Vignoletti F, Muñoz F, Arzate H, Villalobos C, Nuñez L, Caffesse RG, Sanz M. Periodontal regeneration following implantation of cementum and periodontal ligament-derived cells. *J Periodont Res* 2012;47:33-44.
52. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Sampath Narayanan A, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol* 2012;227:649-657.



53. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology* 2000 2000;24:253-269.
54. Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J* 1992;6:2990-2995.
55. Pitaru S, Narayanan SA, Olson S, Savion N, Hekmati H, Alt I, Metzger Z. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodont Res* 1995;30:360-368.
56. Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res* 1996;11:686-692.
57. Yoshii T, Harada F, Saito I, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Maeda T. Immunoexpression of aquaporin-1 in the rat periodontal ligament during experimental tooth movement. *Biomed Res* 2012;33:225-233.
58. Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Teranaka T, Narayanan AS. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 2001 ;29:242-248.
59. Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranaka T, Sampath Narayanan A. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone* 2002 ;31:606-611.
60. Pitaru S, Savion N, Hekmati H, Olsen S, Narayanan SA. Binding of a cementum attachment protein to extracellular matrix components and to dental surfaces. *J Periodont Res* 1992;27:640-619.
61. Nancollas GH, and Mohan MS (1970) the growth of hydroxyapatite crystals *Arch Oral Bio* 15, 731-745
62. Tomson MB, Nancollas GH (1978) Mineralization kinetics: A Constant Composition Approach. *Science* 200, 1059-1060
63. Nancollas GH and Tomazic B (1974) Growth of calcium phosphate on hydroxyapatite crystals. Effect of supersaturation and ionic medium *J Phys Chem* 78, 2218-2225
64. Nielsen AE and Christoffersen J (1982) The mechanism of crystallization and dissolution. Dahlem Konferenzen, Berlin, Germany
65. Burton WK, Cabrera N and Frank FC (1951) The growth of Crystal and the equilibrium structure of their surfaces. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 243, 299-358
66. Nancollas GH and Zawacki SJ (1984) Inhibitors of crystallization and dissolution. Elsevier, Amsterdam
67. Gilman H and Hukins DW (1994) Seeded growth of hydroxyapatite in the presence of dissolved albumin at constant composition. *J Inorg Biochem* 5, 31-39
68. García-Ruiz JM. Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Methods Enzymol.* 2003; 368:130-54.
69. Hunter GK, O'Young J, Grohe B, Karttunen M, Goldberg HA. The flexible polyelectrolyte hypothesis of protein-biomineral interaction. *Langmuir.* 2010 Dec 21;26(24):18639-46.



-
70. Mann, S.; Heywood, B. R.; Rajam, S.; Birchall, J. D. *Nature* 1988, 334(6184), 692–695.
 71. Mann, S.; Archibald, D. D.; Didymus, J. M.; Douglas, T.; Heywood, B. R.; Meldrum, F. C.; Reeves, N. J. *Science* 1993, 261, 1286–1292.
 72. Sicheri, F.; Yang, D. S. *Nature* 1995, 375(6530), 427–31.