



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**NUCLEACIÓN Y/O INHIBICIÓN DEL PROCESO DE MINERALIZACIÓN *IN VITRO*
A PARTIR DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DEL
CEMENTO.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
RODRIGO CORREA PRADO**

TUTORES:

**DR. JESÚS ÁNGEL ARENAS ALATORRE
INSTITUTO DE FÍSICA**

**DR. HIGINIO ARZATE
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL**

.....Ciudad.Universitaria,.CD..MX.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Gracias dios por permitir concluir esta nueva etapa de mi vida.

Gracias a mis tutores **Dr Higinio Arzate** y **Dr. Jesús Arenas Alatorre** por la confianza, apoyo y siempre estar pendiente de mis resultados formando un carácter disciplinario en ésta nueva etapa de mi vida.

Gracias a mi esposa **Alicia Guerrero** por ser perseverante en esta nueva etapa, por apoyarme, motivarme por cuidar de nosotros y siempre ser tan atenta, eres la fiel compañera de mi vida con la que tengo la dicha de compartir cada paso que doy en el ámbito profesional y personal. Me siento orgulloso de tenerte a mi lado pues eres parte indispensable de todos los proyectos y quién me inspira siempre a avanzar.

Teresa Prado, mi Mamá, debo agradecerte infinitamente por todo el amor, sacrificio y esfuerzo que siempre das por mí, por darme tu apoyo, por tener siempre las mejores palabras de aliento y sabiduría que me inspiran en los momentos de debilidad y sobretodo gracias por tener fé y confianza en todas las decisiones de mi vida.

Reina Prado tu cariño y amor que es incondicional en mi vida. No tengo palabras para agradecerte la confianza y apoyo que siempre me tienes. Sabes que eres más que mi tía, el amor y cariño que siento por ti es representativo al sentimiento y cariño materno.

A la hermosa familia que tengo, inculcada por mis maravillosos abuelos **Jovita Dominguez** y **Macario Prado** por su apoyo, calidez y unión incondicional.

A mis compañeros de laboratorio, **Gonzálo, Marichuy, Sinaí, Lía, Enrique, Fabiola, Cecy, Sonia** y **Micado** gracias por que además de ser un excelente equipo de trabajo son unos amigos ejemplares.

A mis amigos **Rodrigo Mora, Daniel Razo, Alí Sosa** y **Abel Cortéz** son excelentes personas de las que he aprendido tanto, por lo que han sido un gran apoyo en mi formación personal.

Al personal docente y técnico del **Instituto de Física; Dr. Samuel Tehuacanero, Fís. Roberto Hernández, Dr. Manuel Aguilar, Arq. Diego Quintero** y **Cristina Zorrila** por su apoyo en SEM, TEM y micro-Raman

Gracias a la **U.N.A.M, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, Facultad de Odontología** y apoyo **CONACyT 224081** por mostrar confianza en este proyecto y fomentar la investigación y educación en México.

*Para mis hijas **Camila** y **Tamara** por ser lo mejor de mi vida, por acompañarme incondicionalmente y a pesar de todas las adversidades siempre recibirme con una enorme sonrisa y un te amo, por su paciencia, tiempo y sobretodo el amor y cariño que día a día me demuestran.*

Índice

Resumen.....	5
Abstract.....	6
Antecedentes.....	7
Periodonto.....	7
Encía.....	8
Ligamento Periodontal.....	8
Hueso alveolar.....	9
Cemento Radicular.....	10
Osteopontina y Sialoproteína ósea.....	12
Proteína Gla.....	13
Proteína de Adhesión del Cemento (HACD1/CAP).....	15
Proteína del Cemento 1 (CEMP1)	16
Uso de péptidos.....	17
Sistema de Contradifusión.....	19
Planteamiento del problema.....	21
Justificación.....	22
Hipótesis.....	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos.....	22
Materiales y Métodos.....	23
Formación de cristales de fosfato calcio.....	23
Recuperación y caracterización de los cristales.....	24
Resultados.....	24
Discusión.....	40
Conclusión.....	47
Bibliografía.....	49

Resumen

El cemento radicular es un tejido mineralizado especializado el cuál cubre la superficie radicular de los dientes, con características similares al hueso en sus componentes orgánicos e inorgánicos, sin embargo, no presenta aporte sanguíneo directo, inervación ni drenaje linfático lo hace único y especial para su estudio. Recientemente se han identificado dos proteínas específicas de este tejido, la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP) involucradas en el proceso de mineralización y en la nucleación de cristales de fosfato de calcio *in vitro*.

Actualmente el uso de péptidos sintéticos ha revolucionado la terapia médica hacia blancos específicos para emular las funciones biológicas de diversas moléculas, desarrollando una terapia sin compromiso inmunológico, respuesta específica, mayor velocidad en su síntesis y bajo costo resultando como una excelente alternativa a futuro.

Utilizando péptidos sintéticos derivados de CEMP1 y HACD1/CAP realizamos estudios de nucleación de cristales de fosfato de calcio *in vitro*, mediante un sistema de contradifusión en gel de silicato libre de células, evaluando si al combinarlos presentaban acción sinérgica o antagonista durante la nucleación. El estudio se complementó mediante un análisis estructural y químico de los cristales donde se emplearon técnicas microscópicas tales como SEM, HRTEM, EDS y espectroscopía μ RAMAN.

Los resultados mostraron que pCAP tiene la capacidad de nuclear cristales de hidroxiapatita (HAp), de modo individual y en combinación con los péptidos de CEMP1, por otra parte el péptido CEMP1-A participa en la nucleación de cristales de fosfato octacálcico y CEMP1-B mostró función antagonizante en el proceso de nucleación de cristales de fosfato de calcio desarrollando una fase mineral inmadura (rt Ca/P -1.2), esta información fue mediante el análisis químico por EDS y por medio de SEM se identificaron diferencias estructurales entre todos los grupos. Utilizando tablas cristalográficas internacionales (PDFfiles) se compararon los resultados obtenidos en HRTEM.

Esta información puede generar nuevas ideas y estrategias del uso de péptidos sintéticos derivados de proteínas del cemento como nucleadoras de cristales de fosfato de calcio en el área mineralización de tejidos y conocer las secuencias que mimeticen el comportamiento mineralizante de la proteína nativa.

Abstract

Cementum is a specialized mineralized tissue which covers the root surface of teeth, it has similar features to bone in its organic and inorganic components, however it doesn't have direct blood supply, innervation and lymphatic drainage these features make it unique and special for study. Recently two specific proteins of this tissue have been identified, the Cementum protein 1 (CEMP1) and the Cementum Attachment Protein (HACD1 / CAP) involved in the process of mineralization and nucleation of calcium phosphate crystals *in vitro*.

Currently the use of synthetic peptides has revolutionized therapy from specific targets to emulate biological functions of various molecules, developing therapies without immune commitment, specific response, higher speed of synthesis and low cost it being as an excellent future alternative.

Using synthetic peptides derived from CEMP1 and HACD1 / CAP we carry out studies of crystal nucleation of calcium phosphate *in vitro* using a counter-diffusion system in silicate gel without cells and they were evaluated whether to combine them showed synergistic or antagonist action during nucleation. It was complemented by structural and chemical analysis of the crystals by the use of microscopy techniques as SEM, HRTEM, EDS and μ RAMAN analysis.

The outcomes showed that pCAP has the ability of hydroxyapatite (HAp) crystal nucleation individually and combine it with other peptides from CEMP-1, on the other hand the CEMP1-A peptide participate in the octacalcium phosphate (OCP) crystal nucleation and CEMP1-B showed antagonist function in nucleation

process of calcium phosphate crystals and developing an immature mineral phase, these information were obtained by a chemical analysis by EDS, SEM wich recognized structural differences between all groups and by international crystallography tables and were compared the outcomes achieved by HR-TEM

This information could open up new ideas and strategies in the use of synthetic peptides from cementum proteins as calcium phosphate crystal nucleator in mineralized tissue subject and know the sequences which mimic the mineralizing behavior of native protein.

Antecedentes

Periodonto

El periodonto es un conjunto de tejidos que soportan y protegen a los órganos dentales permitiendo la unión del diente al hueso alveolar. Está constituido por cuatro componentes estructurales: hueso alveolar, ligamento periodontal, cemento radicular y encía ⁽¹⁾. La mucosa oral esta compuesta por tres zonas:

1. La encia y la mucosa que cubren el paladar duro, denominada mucosa masticatoria.
2. El dorso de la lengua cubierta por mucosa especializada.
3. La mucosa oral, una membrana que cubre el resto de la cavidad oral, formando parte la encia, la cuál cubre los procesos alveolares y envuelve el cuello de los dientes.

Estos tejidos provienen del ectomesenquima y juntos participan en el desarrollo del periodonto. Sin embargo el periodonto esta sujeto a variaciones morfológicas y funcionales, así como a cambios asociados con la edad ⁽²⁾.

Encía

En condiciones normales en un adulto la encía esta compuesta por epitelio gingival y tejido conectivo cubriendo el hueso alveolar y las raíces de los dientes a nivel coronal a través de la unión cemento-esmalte ^(1, 2).

La encía esta dividida anatómicamente en marginal, adherida e interdental. Cada una de ellas presenta diferentes funciones y características histológicas, distintos espesores de acuerdo a su función además que estas diferencias presentes en la estructura de la encia son unicas e indispensables como barrera fisiológica para evitar el ingreso de microorganismos y agentes nocivos en el tejido ⁽¹⁾.

Así mismo el componente epitelial de la encía presenta diferentes variaciones morfológicas las cuales se adaptan a los tejidos del diente y al hueso alveolar. Estos componentes estan constituidos por el epitelio gingival oral, el epitelio del surco gingival y el epitelio de unión, este último no solo forma el sistema de unión epitelial a la superficie del diente, también proporciona un vehículo para el movimiento bidireccional de sustancias entre la encía, tejido conectivo y la cavidad oral ^(3,4).

Ligamento Periodontal

El desarrollo del ligamento periodontal comienza con la formación radicular antes de la erupción dental, tanto en su desarrollo como en la madurez contiene células troncales con potencial de diferenciación a osteoblastos, cementoblastos y fibroblastos ^(5- 8).

El ligamento periodontal es un tejido conectivo especializado, localizado entre el cemento radicular y el hueso alveolar. Presenta fibras que forman una malla que se extienden entre el cemento y el hueso. Su principal función es soportar a

los órganos dentarios, manteniéndolos en sus alveolos, soportar las fuerzas masticatorias, actúa como receptor sensorial para el posicionamiento oclusal durante la masticación y como depósito celular en la homeostasis del tejido en reparación y regeneración ^(5, 9,10). Estas fibras están formadas por colágena tipo I y III, siendo producidas por los fibroblastos ⁽²⁾. Tiene potencial de presentar una remodelación constante y gracias a las células presentes en este tejido controlan la síntesis y resorción del cemento radicular, ligamento y hueso alveolar. Sin embargo una vez que ha sido destruido el daño es irreversible ⁽¹¹⁾.

Hueso Alveolar

Constituido por la maxila y mandíbula además de formar los alveolos de los órganos dentarios. Es originado cuando los dientes erupcionan, proporcionando un anclaje para la formación del ligamento periodontal ⁽¹¹⁾.

En humanos se puede dividir en dos partes:

- A) El proceso alveolar; donde se alojan las raíces de órganos dentarios ya erupcionados.
- B) El cuerpo basal.

Se encuentra organizado por un alveolo que forma la pared de las criptas óseas, una pared cortical interna y externa, siendo más delgadas estas capas en el maxilar y más gruesas en la cara vestibular de los premolares y molares mandibulares ^(5,9), entre ambas corticales se encuentra un hueso esponjoso, ocupando la parte central del proceso alveolar con presencia de varios sistemas de Havers presentes en trabéculas y laminas óseas ^(5, 9,12) con un espesor de 0.1 a 0.4 mm. ⁽¹³⁾. Las regiones apical y coronal, se conectan con el ligamento periodontal a los espacios de la médula ósea por medio de los canales de Volkmann donde pasan vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas ⁽⁵⁾.

La composición bioquímica de la matriz extracelular esta constituida por 65% de material inorgánico; como minerales, calcio y grupos fosfatos en forma de cristales de HAp $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ⁽¹⁴⁾, carbonatos, citratos y algunos otros iones como sodio, potasio, magnesio etc. Un 35% de material orgánico; teniendo como principal componente la colágena tipo I en un 90% y colágena tipo III, además proteínas no colágenas como la osteocalcina (OCN) y la sialoproteína ósea (BSP), algunos componentes no específicos como osteopontina (OPN), osteonectina (ON) y proteínas morfogenéticas del hueso (BMP's)^(11, 15).

Cemento Radicular

Es un tejido conectivo especializado mineralizado, calcificado, avascular de origen mesenquimal que cubre la superficie radicular de los órganos dentarios desde la unión cemento-esmalte, se localiza en el cuello de los dientes en la unión de la corona y la raíz dental hasta el ápice^(11,14). Una de las funciones del cemento radicular es el anclaje para las fibras del ligamento periodontal, específicamente proporciona unión de las fibras de Sharpey al hueso alveolar⁽¹⁶⁾.

Las diferencias morfológicas, histológicas y funcionales aparecen a lo largo de la longitud de la raíz, siendo determinantes para su clasificación⁽¹⁷⁾:

- A) El cemento acelular, encontrado en la porción coronal de la raíz, mientras que el cemento celular se forma después de la erupción del diente y se ubica en la parte apical de la raíz de los órganos dentarios. Presenta aproximadamente 50% de contenido inorgánico constituido principalmente por cristales de HAp y 50% de contenido orgánico, constituido por un 90% de colágena tipo I con un importante papel estructural durante el proceso de mineralización además de servir como un reservorio para la nucleación de cristales de HAp⁽¹⁸⁾.
- B) La colágena tipo III en bajas concentraciones, la cuál recubre las fibras de colágena tipo I. Colágena tipo XII en menor proporción, trazas de

colágena V y VI con localización peri-celular y tipo colágena tipo XIV asociada a las fibras de Sharpey.

- C) Glicosaminoglicanos sulfatados y carboxilados.
- D) Algunos proteoglicanos que se asocian principalmente a los cementocitos y cementoblastos, se han localizado e identificado versicano, decorina, biglicano, fibromodulina y lumicano^(9,15,19,20-22).
- E) Las proteínas no colágenas del cemento radicular en su mayoría también están presentes en el hueso incluyendo la BSP, proteína de matriz dentinaria-1 (DMP-1), fibronectina (FN), OCN, ON y OPN ⁽¹⁵⁾ , además de factores de crecimiento como el factor de crecimiento tipo insulínico (IGF) ⁽²⁰⁾ .

El cemento radicular funciona como excelente depósito de factores de crecimiento y cuando sean necesarios, pueden ser liberados por procesos como la desmineralización, sirviendo como reparadores o regeneradores de tejido. Se ha demostrado la capacidad mediante extractos del cemento para promover la migración, adhesión, actividad mitógena y diferenciación, las cuáles son esenciales para la regeneración periodontal⁽²³⁻²⁴⁾. Por ejemplo, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el cuál se une fuertemente a la heparina, además de existir otros factores mitogénicos con afinidad moderada a la heparina y que están presentes en el cemento pero no el hueso alveolar ⁽²⁵⁾.

La presencia del factor de crecimiento derivado del cemento y otros factores en el cemento radicular generan un potencial para la regulación de su metabolismo y de los tejidos que lo rodean, sirviendo como potente inductor de moléculas de crecimiento hacia las proteínas localizadas en este tejido, otorgándoles un papel biológico como promotoras de la regeneración periodontal ^(23,26).

La cementogénesis estudiada por Slavkin y Boyde en 1975 se considera que durante la formación radicular, el mesénquima apical continúa proliferando para formar el periodonto, mientras que el epitelio interno y el externo se fusionan a

nivel cervical formando la vaina epitelial de Hertwig (HERS). Las células de la vaina epitelial proliferan y migran hacia la zona apical, dividiéndose en la papila y el folículo dental ⁽²⁷⁾.

Posterior a esto las células de la vaina epitelial migran a la zona donde se localizara el ligamento periodontal en la raíz donde se vuelven a asociar para formar los restos epiteliales de Malassez. Por lo que los cementoblastos derivan de una transformación ecto-mesenquima de las células de la HERS, las cuáles después secretan la matriz del cemento radicular ^(22, 28, 29).

Este tejido es similar al hueso alveolar y a la dentina, sin embargo, cuenta con características únicas que lo hacen diferente como son: ausencia de vascularización directa, carece de inervación y drenaje linfático, tiene un bajo recambio metabólico y no sufre procesos de remodelación sino que tiene un proceso de aposición constante ^(20,21).

Algunas otras proteínas encontradas en el cemento cumplen la función de ser nucleadoras de cristales de fosfatos de calcio, en donde un número de moléculas se van agregando o depositando hasta formar diversos núcleos con capacidad de desarrollar un crecimiento mineral. Esta nucleación puede ser homogénea si ocurre sin la participación de elementos externos, solo con la saturación local de minerales que formarán la fase cristalina, o heterogénea si existe la participación de elementos externos como son macromoléculas en el proceso de biomineralización del cemento radicular ⁽³⁰⁾.

Osteopontina y Sialoproteína ósea

Estas proteínas son importantes en el llenado de espacios creados durante el montaje de la colágena permitiendo que el depósito de minerales se extienda a través de toda la malla de colágena ^(31,32). El principal papel de estas proteínas es la regulación, nucleación y crecimiento de cristales de HAp. Se ha sugerido

que la OPN y la BSP son necesarias para la iniciación de la formación de cristales en las fibrillas de colágena tipo I que se encuentran altamente ordenadas ⁽¹⁶⁾.

La OPN y BSP son proteínas ácidas, no colágenas, localizadas en los espacios formados durante el ensamblaje de la colágena, permitiendo el depósito mineral a través de una malla formada por la colágena I y la regulación del crecimiento de cristales de HAp ⁽³³⁾. La OPN se encuentra en el ligamento periodontal de dientes maduros, regula la migración, diferenciación y vida celular mediante interacciones mediadas por integrinas $\alpha\nu\beta3$ ^(34,35), presentan dos dominios, un dominio poli-Asp con afinidad hacia el Ca^{2+} de las superficies minerales por lo que permanecen unidas a la colágena de la matriz y un dominio RGD (arginina-glicina-aspartico) que les permite su unión a células.

La OPN funciona como inhibidora de la mineralización en su forma fosforilada y su expresión está marcadamente reducida en los ratones con "knock out" para la nueva proteína nuclear-1(NPP1) ⁽³⁶⁻³⁹⁾.

La BSP se expresa en células que recubren al cemento radicular por lo que una hipótesis es que esta proteína modula la cementogénesis, quimio-atracción, adherencia y diferenciación cementoblástica ^(34,35), presenta dos dominios poli-Glu con función similar al dominio de la OPN, presenta dominios RGD ⁽³⁶⁾, permitiendo la unión a células y asociación con diversos agregados minerales adquiriendo una potente y específica capacidad nucleadora de cristales de HAp in vitro ⁽³⁷⁾.

Proteínas con residuos Gla

La proteína Gla de la matriz extracelular (MGP) y la OCN, son proteínas asociadas a tejidos duros ⁽⁴⁰⁻⁴⁵⁾, ambas presentan afinidad por el calcio y la HAp a través de sus residuos Gla.

La OCN es expresada en el espacio interradicular y la superficie celular radicular sobre el cemento acelular y celular (más abundante) donde se ha planteado que

MGP se acumula sobre la superficie, evitando la hipercalcificación de esta zona ⁽⁴⁵⁾.

MGP tiene una masa molecular de 14 kDa ⁽⁴⁶⁾, fue aislada originalmente de hueso en un modelo murino, presenta 4 residuos de ácido glutámico y -carboxilados, tiene una alta expresión en células del musculo liso vascular y condrocitos, sin embargo no se expresa de manera significativa por los osteoblastos *in vivo* ⁽⁴⁷⁾. Al alterar la expresión de la proteína Gla se presentan dos anormalidades:

- a) Extensa mineralización en la matriz extracelular de arterias.
- b) Mineralización prematura del cartílago ⁽⁴⁸⁾.

En los seres humanos al encontrarse mutada esta proteína presenta una alteración denominada síndrome de Keutel, caracterizado por condrodisplasia y mineralización del cartílago ectópico ⁽⁴⁹⁾.

Esta proteína evita el depósito de cristales de oxalato de calcio en las paredes de vasos sanguíneos, además de ser expresada en las rodillas, inhibiendo el crecimiento de cristales de oxalato de calcio monohidratado ⁽⁵⁰⁾. En humanos la expresión del gen MGP es sobre regulado en la formación de placas de arteriosclerosis ⁽⁵¹⁾. Junto con la osteocalcina presentan mayor contenido de residuos Gla y alta afinidad al calcio ⁽⁴⁰⁾.

La localización de la OCN en mamíferos es bastante limitada, se encuentra en el hueso, dentina y cemento radicular ⁽⁴¹⁾, actuando sobre estos tejidos como un regulador negativo para el depósito mineral. Esto se ha observado al utilizar OCN purificada presentando una conversión espontanea de la fase mineral de HAp a brushita ($\text{Ca}(\text{PO}_3\text{OH}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ esta es fase mineral cercana a la hidroxiapatita), inhibiendo la formación de cristales de HAp en soluciones supersaturadas de calcio/fosfato en un sistema *in vitro* ⁽⁵²⁾.

Proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP)

Fue la primera proteína aislada del cemento radicular, purificada y caracterizada parcialmente a partir de extractos de cemento radicular maduro. Es una proteína con un peso molecular teórico de 14.9 kDa ⁽⁵³⁻⁵⁶⁾ y un punto isoeléctrico de 7.78, además de carecer de péptido señal ⁽⁵⁶⁾.

El gen de la proteína HACD1/CAP está localizado en el cromosoma 10, region13-p14, y codifica para dos isoformas, una de 288 y la segunda de 140 aminoácidos denominada HACD1/CAP y contiene los exones 1 y 3 de los 6 que conforman el gen. Su DNAC está conformado por 1435 pb. En la isoforma 1 existe un aumento de su expresión durante el desarrollo y etapas postnatales de músculo cardíaco y una menor expresión en músculo esquelético^(57,58).

Por otra parte la isoforma 2 se ha identificado en la participación en el reclutamiento y la diferenciación celular durante la formación del cemento. Se expresa en células del folículo dental, promoviendo su adhesión y diferenciación ⁽⁵⁶⁾ además de ser localizada en cementoblastos, cementocitos y células paravasculares del hueso alveolar ⁽⁵⁷⁾. Se ha demostrado que los fibroblastos tratados con BMP-2 expresan HACD1/CAP y ALP, por lo que BMP-2 puede reclutar progenitores e inducir la diferenciación celular por medio de la expresión de moléculas específicas del cemento radicular ⁽⁵⁹⁾.

Las vías de señalización Smad-1 (vía canónica de señalización de BMP) y MAPK han sido identificadas y propuestas como las responsables en la proliferación y diferenciación celular ⁽⁶⁰⁾.

Las células óseas migran y se adhieren mejor a superficies cubiertas con HACD1/CAP que las células del ligamento periodontal, sin embargo, estas últimas lo hacen mejor que los fibroblastos gingivales. Un patrón similar es observado al evaluar la capacidad de HACD1/CAP de unirse a estas líneas celulares ⁽⁶¹⁾.

La proteína recombinante HACD1/CAP (hrHACD1/CAP) demostró estar

asociada a la formación y composición de cristales de HAp en un sistema libre de células *in vitro* ⁽⁵⁶⁾.

Proteína del Cemento 1 (CEMP1)

Tiene una masa molecular de 25.9 kDa y está formada por 247 aminoácidos ⁽⁵⁵⁾, se ha observado bajo diversas investigaciones que actúa como reguladora de la actividad de los cementoblastos, induciendo la diferenciación de células no osteogénicas a un fenotipo cementoblástico/osteoblástico, participa en el proceso de biomineralización, migración y proliferación de fibroblastos gingivales además de promover la nucleación de los cristales de fosfato octacálcico (OCP), fase mineral que antecede la formación de cristales de HAp ⁽⁶²⁾.

La proteína CEMP1 expresada en *Pichia pastoris* presenta una glicosilación del 2.4%, es una proteína termoestable la cuál presenta una masa molecular de 28700 Da, mediante un espectro de dicroísmo circular se mostró la presencia de estructura secundaria y revelando un contenido de alpha-helice de 28.6%, un 9.9% de láminas beta y 61.5% de estructura al azar ⁽⁶³⁾.

El uso terapéutico de CEMP1 ha sido probado en la regeneración de defectos óseos de tamaño crítico en ratas Wistar. Al incluir a CEMP1 en una matriz de gelatina y ser colocada en defectos de 9mm en las calvarias de ratas, mediante cortes histológicos e imágenes por micro tomografía se observó que después de 16 semanas CEMP1 es capaz de regenerar el 97% del defecto óseo ⁽⁶⁴⁾.

Se demostró en otro estudio que hrCEMP1 promueve la capacidad de promover la nucleación de cristales de fosfato octacálcico, fase mineral precedente de HAp además de presentar una alta afinidad por la HAp ⁽⁶⁵⁾.

El gen de CEMP1 se localiza en el cromosoma 16 en la región p13.3. El gen está conformado por 1374 nucleótidos y hasta la fecha esta proteína no ha mostrado tener homología con ninguna otra *in silico* ⁽⁶²⁾.

Estudios posteriores revelaron que CEMP1 a través de un medio mineralizante promovía la adhesión de fibroblastos gingivales humanos, células del ligamento

periodontal humanos, y células derivadas de hueso alveolar, favoreciendo la expresión de fosfatasa alcalina y la producción de matriz extracelular mineralizada en células mesenquimales embrionarias sin un fenotipo definido⁽⁶⁶⁾.

Mediante un estudio con micro arreglos de expresión para evaluar el efecto biológico de la sobreexpresión de CEMP1 en fibroblastos gingivales humanos. Se demostró que una cantidad importante de genes asociados con el desarrollo celular, proliferación, crecimiento celular y muerte celular fueron encontrados en los principales resultados de los micro arreglos usando dos herramientas de análisis funcionales, DAVID e IPA. Estas funciones celulares específicas están asociadas con algunos aspectos del desarrollo de cáncer, sugiriendo que CEMP1 podría actuar como un oncogén⁽⁶⁷⁾.

En la actualidad los péptidos bioactivos tienen una amplia gama de propiedades biológicas, las cuáles podrían solucionar las deficiencias del uso de proteínas recombinantes. Recientemente fue posible determinar el papel que tiene el péptido de CEMP1 (CEMP1p1) el cuál aumenta la actividad de ALP y la formación de nódulos de calcio, induciendo la diferenciación de células del ligamento periodontal humano (hPLC) a nivel transcripcional y traduccional hacia un fenotipo mineralizante *in vitro*, por lo que podría resultar como un importante agente terapéutico en la estimulación, formación y regeneración ósea, resultando como alternativa para el tratamiento de defectos óseos⁽⁶⁶⁾.

Uso de péptidos

El uso y acoplamiento entre proteínas de la matriz extracelular o recombinantes como método terapéutico para procesos de remineralización aún no está definido, además de presentar diversas limitaciones técnicas, financieras, dificultad durante su extracción y purificación de las mismas, las recientes investigaciones se han centrado en el desarrollo de compuestos peptídicos miméticos o en la identificación de dominios funcionales dentro de las mismas proteínas. Diversas proteínas de la matriz extracelular compuestas por proteínas

como colágenas, vitronectina, OPN, factor de Von Willebrand, tenascina, BSP, fibrinógeno y laminina contienen un dominio conservado con tres aminoácidos como dominio funcional denominado RGD (arginina, glicina y ácido aspártico), potencializando la adhesión y teniendo un papel importante en la proliferación y diferenciación celular ^(66, 68-72).

Algunos de los beneficios en el uso de péptidos son que al tener una cadena corta de aminoácidos pueden ser empacados en altas densidades, logrando usar su dominio funcional sin dificultades, obteniendo una orientación molecular adecuada y al no ser proteínas bioactivas evitan el proceso de degradación proteolítica así mismo una respuesta inflamatoria ⁽⁷²⁾.

Por otro lado se ha observado que los péptidos funcionales derivados de la amelogenina, (proteína expresada durante la formación del esmalte dental que contribuye a formar el tejido más duro y mineralizado del cuerpo humano), pueden interactuar en sistemas libres de células como agentes remineralizantes, además de contribuir en la regeneración del tejido periodontal ⁽⁷⁰⁾.

Algunos investigadores encontraron pequeños péptidos de BMPs que promueven el crecimiento osteoblástico. Por ejemplo, uno péptido de BMP-2 incrementa la actividad fosfatasa alcalina en osteoblastos ⁽⁷²⁾, también Kirkwood *et al.* observó que algunos péptidos de BMP-7 fomentan el proceso de mineralización de osteoblastos ⁽⁷³⁾. En el 2008 Chen & Webster analizaron que péptidos de BMP-7 resultaron ser más apropiados para su uso en nano materiales promoviendo la proliferación y deposición de minerales por parte de los osteoblastos ⁽⁷⁴⁾.

Se comparó el potencial que presenta un pequeño péptido, el cuál esta basado en la amelogenina para promover la remineralización sobre esmalte cariado contra un grupo control con Fluoruro de Sodio (NaF) y otro solo con HEPES (Acido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'etanosulfónico), los resultados fueron significativos para el grupo del péptido promoviendo la remineralización del esmalte cariado, actuando como un biomaterial remineralizante prometedor en el

tratamiento de caries primaria ⁽⁷⁵⁾.

El uso de péptidos sintéticos surge como alternativa en diversas áreas, como la ingeniería mineral desarrollando capas minerales de HAp, durante el crecimiento y formación de cristales de HAp, desarrollo de vacunas, péptidos vasoactivos como los reguladores de la enzima convertidora de angiotensina en pacientes con hipertensión y daño renal, algunos otros péptidos se encuentran en etapas clínicas y preclínicas para el tratamiento de osteoporosis como el antagonista de dickkopf-1, antagonista de la activina A, análogo de la arrestina- β , calciolíticos e inhibidores de la tirosina-sinasa Src y como inductores en la diferenciación osteoblástica en células madre mesenquimales ^(71,76-79), como en estudios realizados por Gungormus *et al.* 2012 en el que utilizan el extremo terminal de AMEL y de AMBN induciendo la diferenciación osteoblástica ⁽⁷⁰⁾.

Estudios recientes mostraron el efecto del péptido de CEMP-1 (CEMP-1p1) como inductor del proceso de mineralización distinto a los ya reportados, que tienen la capacidad de inducir a la diferenciación de células de un fenotipo no mineralizante a uno mineralizado, también se demostró un aumento en la proliferación celular por parte del péptido CEMP-1p1 en comparación con CEMP-1, en otra estudio se demostró que un péptido constituido por los últimos 15 aminoácidos de la secuencia de HACD1/CAP tiene la capacidad de regular la morfología y madurez de cristales en un sistema libre de células, promoviendo la nucleación de cristales de HAp ^(56,66).

Los resultados de este estudio demostraron que los péptidos derivados de ambas proteínas (HACD1/CAP y CEMP1) tienen la capacidad de promover la nucleación de cristales de fosfato de calcio en un sistema libre de células, provocando interés en las diversas secuencias aminoacídicas que constituyen a estas proteínas por su alta afinidad de unión a la HAp ^(56, 65).

Sistema de contradifusión.

El principio de esta técnica es mediante la precipitación de iones a través de geles de metasilicato que permite observar como proteínas no colágenas entre

otras biomoléculas participan en el proceso de biomineralización mediante la formación de cristales de fosfato de calcio con distinta morfología y grado de mineralización. Este sistema permite identificar biomoléculas con capacidad nucleadora de cristales de fosfato de calcio obteniendo un mejor control en el manejo de las concentraciones, naturaleza en los componentes del gel, difusión de iones mediante condiciones parecidas a las fisiológicas (pH, temperatura y presión) ⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾.

Se han desarrollado a través de los años diversos sistemas para el crecimiento de cristales como geles de agarosa y silicatos. Estos métodos requieren de diversos procedimientos para el crecimiento de nano cristales como la difusión por medio de transferencia en masa, difusión de vapor (VD) y difusión líquido-líquido entre otros. Diversas técnicas son empleadas por un principio de supersaturación de iones a través de un método de contradifusión; por ejemplo, el sistema de capilares basada en mezclar una macromolécula con un gel precargado en el capilar con agentes de cristalización que al momento de interactuar con el gel, permiten la difusión disparando la nucleación y el crecimiento del cristal ⁽⁸²⁾, generando una supersaturación desplazada a través del capilar ⁽⁸³⁾.

El sistema de contradifusión se considera como un método derivado de la técnica de difusión por interface (similar al capilar) la cuál conduce una fuerte supersaturación al inicio de nuestro experimento, presentando una serie de pasos representados en el diagrama 1 (Diag. 1) los cuáles explican la dinámica intrínseca que permite optimizar las condiciones de cristalización necesarias para sintetizar cristales de alta calidad debido a un lento proceso de interacción entre biomoléculas y agentes de cristalización ⁽⁸²⁻⁸⁴⁾.

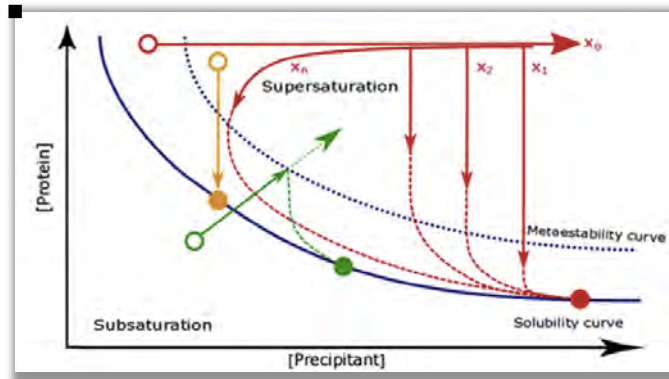


Diagrama1. Fases para la nucleación de cristales de fosfato de calcio con curvas de solubilidad y metaestabilidad. Es importante recordar que mientras la curva de solubilidad es definida termodinámicamente, la curva de metaestabilidad tiene naturaleza cinética y depende de que tan rápido el sistema se mueve hacia la región de supersaturación.

[http:// dx.doi.org/10.1016/j.abb.2015.12.010](http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2015.12.010)

Por la facilidad de mimetizar las propiedades como temperatura y pH fisiológico (37°C y 7.4), un proceso de difusión entre Ca^{2+} y PO_4^{3-} , será posible obtener los cristales fácilmente sin riesgo a contaminación mediante el uso de un microscopio estereoscópico o de luz. Por otra parte el gel desarrollará un papel como andamio de estos cristales sin interaccionar con el sistema de nucleación de las proteínas y péptidos alojados sobre el sistema.

Planteamiento del problema

Mediante estudios que utilizan el método de contradifusión en gel, se ha logrado mimetizar el proceso de nucleación de diversas proteínas participantes en los procesos de biomineralización, en el laboratorio de Biología periodontal y tejidos mineralizados se ha desarrollado éste método para comprobar la capacidad de nucleación de la proteína HACD1/CAP y CEMP-1 sin embargo, se requiere ampliar las investigaciones acerca del uso de péptidos derivados de estas proteínas así como sus respectivas propiedades y funciones en el procesos de mineralización, ya que la producción de proteínas recombinantes implica un alto

costo, mayor tiempo de síntesis y un bajo rendimiento, lo que resulta un inconveniente para una futura aplicación terapéutica.

El propósito de esta investigación es analizar el potencial nucleador y/o inhibidor de los péptidos sintéticos derivados de HACD1/CAP y CEMP-1, estableciendo su fase mineral respectivamente y el analizar la ultra estructura de cristales.

Justificación

Actualmente las investigaciones acerca de las proteínas del cemento radicular humano HACD1/CAP y CEMP-1 han logrado obtener un gran impacto con respecto a el tema de biomineralización; sin embargo, gracias a las investigaciones previas en sistemas de contradifusión libres de células han permitido concluir el potencial nucleador de las proteínas HACD1/CAP y CEMP1. Por lo antes mencionado, se sugiere el empleo de péptidos sintéticos ya que además de presentar un bajo costo en su manufactura y facilidad de producción a grandes escalas, existe una disminución en la respuesta inmunológica comparada con el uso de proteínas recombinantes, por lo que cobra importancia el estudio de estos péptidos en la regulación del proceso de biomineralización.

Hipótesis

Las combinaciones de los péptidos derivados de la proteína CEMP1 (A y B) y HACD1/CAP potencian y/o inhiben el proceso de biomineralización en un sistema libre de células.

Objetivo general

Evaluar el potencial nucleador y/o inhibidor de cristales de fosfato de calcio, mediante péptidos derivados de CEMP1 (A y B) y HACD1/CAP utilizando un sistema libre de células.

Objetivos Específicos

- Determinar si los péptidos derivados de CEMP1 (A y B) inhiben o potencian el

proceso de nucleación de cristales de fosfato de calcio.

- Establecer si los péptidos derivados de CEMP1 (A y B) inhiben o potencian el proceso de nucleación de cristales de fosfato de calcio que promueve el pCAP.

Materiales y Métodos

Formación de cristales de fosfato de calcio

El sistema esta conformado por dos cristales de 7 cm x 9 cm x 3 mm, formando un casete, sellados con silicon de vacío y un marco de neopreno de 3 mm de grosor, fueron colocados adaptadores metálicos para asegurar que no existieran fugas. La parte inferior del casete estará conformado por 2 ml de metasilicato de sodio 1.06 gr/mL, 1.08 mL de HEPES buffer 10mM pH 7.4, 0.2 ml de HEPES buffer 10 mM más azida de sodio 1%, 1.08mL de H₃PO₄ 1M en un pH y temperatura fisiológica.

Los grupos experimentales conformado por péptidos derivados de las proteínas CEMP1 y HACD1/CAP fueron divididos de la siguiente manera:

1. CEMP1-A
2. CEMP1-B
3. CEMP1-A+CEMP1-B
4. pCAP
5. pCAP+CEMP1-A
6. pCAP+CEMP1-B

La concentración de los péptidos fue estimada gracias diversos estudios previos sobre las proteínas CEMP1 y HACD1/CAP por lo tanto se agregaron 20 µg de cada péptido de manera individual y combinada por cada mililitro de solución de gel de metasilicato a excepción de CEMP1-B ya que la concentración de 20 µg no formó cristales, la concentración ideal para este péptido es de 40 µg. Dos grupos controles utilizando 20 µg albumina de suero bovino (BSA sigma St Louis

MO) por cada mililitro de solución de gel de silicato y otro grupo vacío (sin agregar péptido). La solución de difusión empleada fue cloruro de calcio a 200 mM preparado en HEPES buffer 10 mM pH final 7.4. Fueron incubados a 37 °C por 7 días.

Recuperación y caracterización de los cristales

Trascurrido el tiempo de incubación, los cristales fueron separados del gel y recolectados con MicroMounts (MiTeGen Ithaca, NY) de 150 μm mediante un microscopio estereoscópico (Stemi SV11 Carl Zeiss) y se almacenaron en tubos eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente se analizaron en el Instituto de Física de la UNAM mediante un Microscopio Electrónico de Barrido de ultra-alta resolución Schottky Field Emission Scanning Electron Microscopy FESEM (JSM-7800F) y el Microscopio Electrónico de Barrido por Emisión Termoiónica de bajo vacío (JSM-5600LV) el cuál permite evaluar estructuras en un orden de 0.7nm, mediante la técnica de electrones secundarios y retrodispersados, se obtuvieron fotografías y análisis químico elemental utilizando espectroscopía por dispersión de energía de Rayos X (EDS) permitiendo realizar un análisis semicuantitativo del porcentaje atómico de los elementos Ca^{2+} y P calculando su relación Ca/P, se utilizó el Microscopio Electrónico de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM) en el equipo JEM2010FEG para determinar la distancia interplanar a partir de la Transformada Rápida de Fourier y con ayuda del software Digital Micrograph se midieron las distancias interplanares corroborando con ello la fase cristalina. Con espectroscopía de μRAMAN se analizaron los grupos funcionales característicos del material experimental y control.

Resultados

Las microfotografías tomadas por FESEM con la señal de electrones secundarios revelan esférulas circulares bien delimitadas con tamaño promedio de 100 a 150 μm . Sin embargo son destacables las diferencias estructurales de las prolongaciones laminares observadas en los grupos experimentales (Fig. 1).

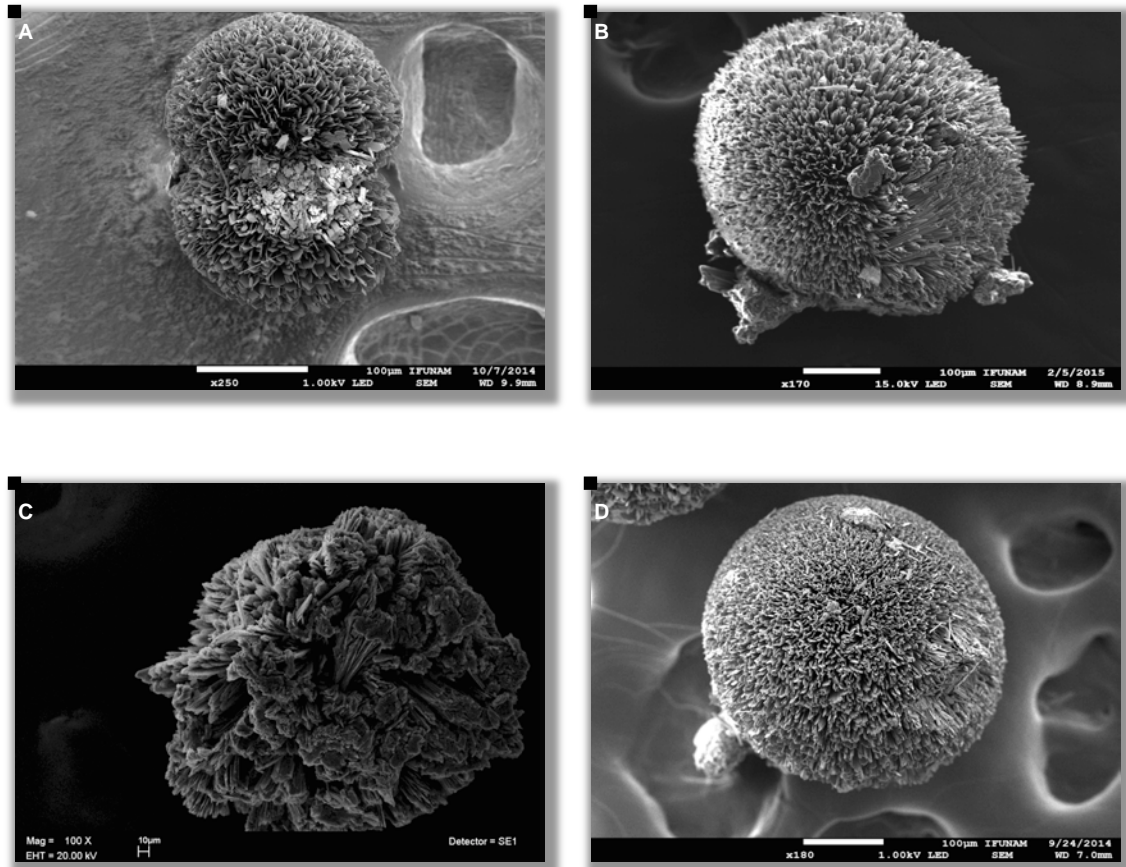


Fig. 1. Microfotografía FESEM a partir de electrones secundarios: pCAP (A), pCAP + CEMP1-A (B), CEMP1-A + CEMP1-B (D). Se observan placas dispuestas de forma irregular que conforman esférulas de diferente morfología con tamaño aproximado de 100 μm .

Se consiguió detallar con una amplificación entre 600x-1000x que las prolongaciones laminares, muestran diferente morfología entre los diferentes grupos. La muestra del péptido CEMP1-A+pCAP presentan prolongaciones bien orientadas hacia un mismo eje de crecimiento, además de un bisel y grosor definido. Por otra parte las láminas observadas de pCAP son más delgadas aunque mantienen biseles bien detallados en su extremo. Mientras CEMP1-B+pCAP, las prolongaciones laminares son mucho más delgadas y organizadas en forma acicular (Fig. 2).

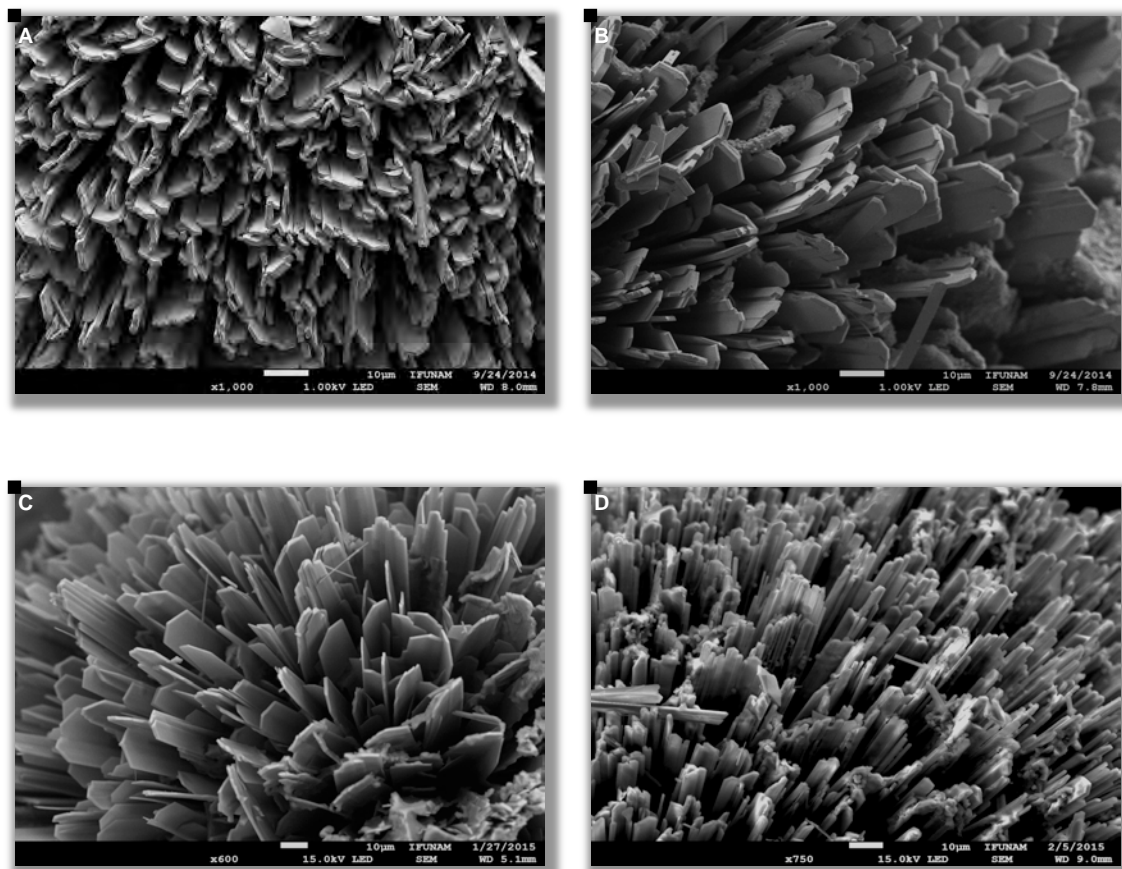


Fig. 2. Microfotografía FESEM por electrones secundarios: CEMP1-A + CEMP1-B (A, B) Amplificación a 1000X con placas laminares, desorganizadas y de mayor dimensión que pCAP a 600X (C) con prolongaciones simétricas y delgadas, originando ángulos con extremos delgados, CEMP1-B + pCAP 750X (D) forma laminas en forma acicular y organizadas con forma de varillas.

Mediante aumentos de 4500X-14000X, se detalló la estructura que presentan estas prolongaciones. CEMP1-A + pCAP forman estructuras diferentes de las otras muestras, un posible bisel o línea intermedia en los extremos que detallan una posible fusión entre dos laminas provocando aumento en sus dimensiones y tamaño en las prolongaciones. La muestra del pCAP, es consistente con láminas delgadas y bien direccionadas y anguladas en sus extremos, presentan un tamaño aproximado entre 10-12 μm (Fig. 3).

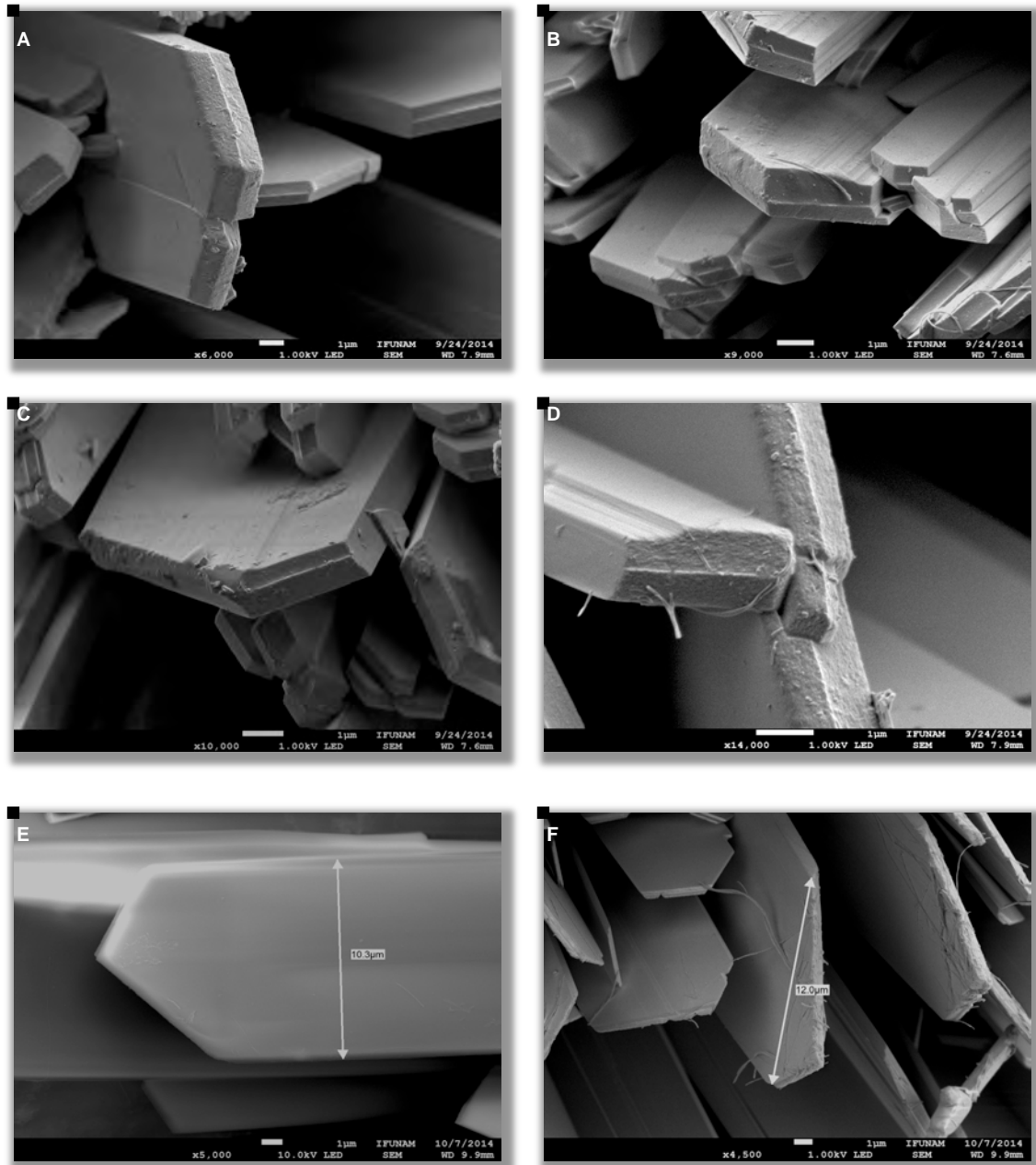


Fig. 3. Microfotografía FESEM con electrones secundarios: CEMP1-A + pCAP (A, B, C, D) y pCAP (E, F). Se logró detallar sobre la estructura que presentan estas prolongaciones, que conforman las esférulas obtenidas, se observa una línea o bisel intermedio en los extremos de las prolongaciones, posiblemente por una fusión en un plano cristalino preferencial.

Algunas esférulas obtenidas permitieron detallar su morfología interna y composición química elemental por medio de imágenes y realizando técnicas de EDS, análisis en línea y mapeo de elementos para determinar los elementos presentes en las muestras (Fig. 4).

Bajo distintos aumentos en la misma muestra (CEMP1-A + pCAP), observamos que las esférulas crecen a partir de un núcleo, en el cuál las láminas ó prolongaciones ya descritas presentan una zona evidente de crecimiento donde emergen al exterior con distinta morfología (acículos, varillas, agujas ó en forma de escamas) observando un grosor relacionado con su eje de crecimiento.

El núcleo detalla distinta morfología y tamaño, está bien delimitado, alojando estructuras circulares de distinta homogenicidad mineral observados bajo la técnica de electrones retrodispersados (Fig. 5).

El análisis en línea se realizó en diferentes zonas de la esférula, destacando las diversas concentraciones de Ca y P. Muestra un aumento en la concentración de Ca en la parte externa y disminuye gradualmente en el núcleo (Fig. 8). Por medio de EDS obtuvimos un informe químico de las estructuras circulares en el núcleo, se evidenció una alta relación de Na y Cl, sin embargo estos elementos son indispensables durante la síntesis del sistema de contradifusión (Fig. 7).

En el mapeo de elementos es posible determinar los elementos presentes en la muestra, entre ellos se encuentra el Na, P, Cl y en menor cantidad el Ca^{2+} (Fig. 9), por medio de puntos colorimétricos con un color independiente para cada elemento.

Por medio de EDS se identificaron elementos químicos de importancia para éste estudio como el Ca y P y su relación definida como rt Ca/P (Fig. 10, 11). Las formas cristalinas en presencia pCAP presentaban un rt Ca/P : 1.56, esta es una fase cristalina relacionada con la HAp (Fig. 11) mientras que al combinarse CEMP1-B+pCAP la relación correspondiente es 1.73 (Fig. 10).

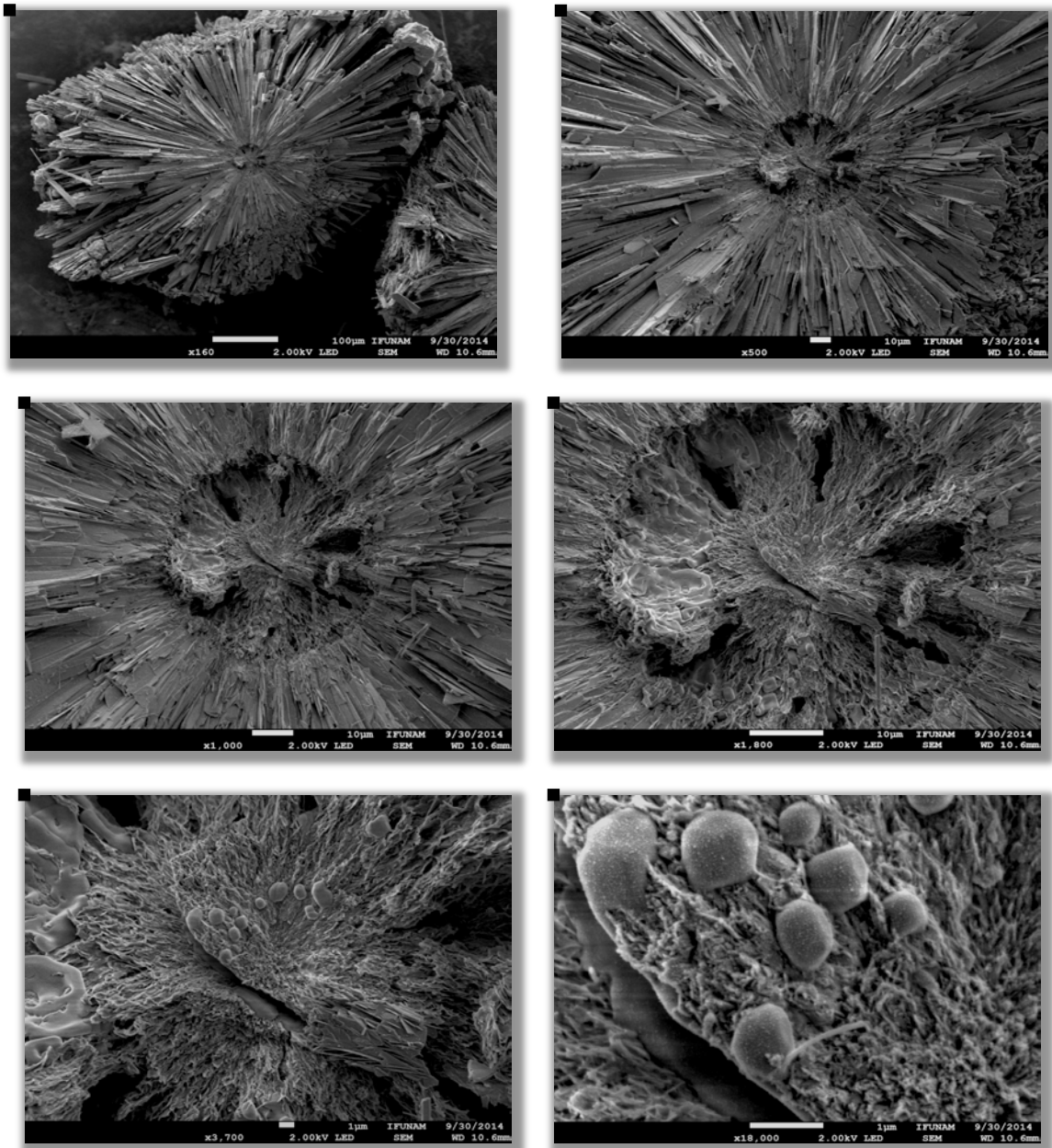


Fig. 4. Microfotografía SEM bajo electrones secundarios, muestra CEMP1-A + pCAP. Imágenes en distinta amplificación y una misma muestra, donde se observa un núcleo bien delimitado con un depósito de estructuras circulares, en el cuál emergen láminas en forma acicular con longitud y tamaño variable.

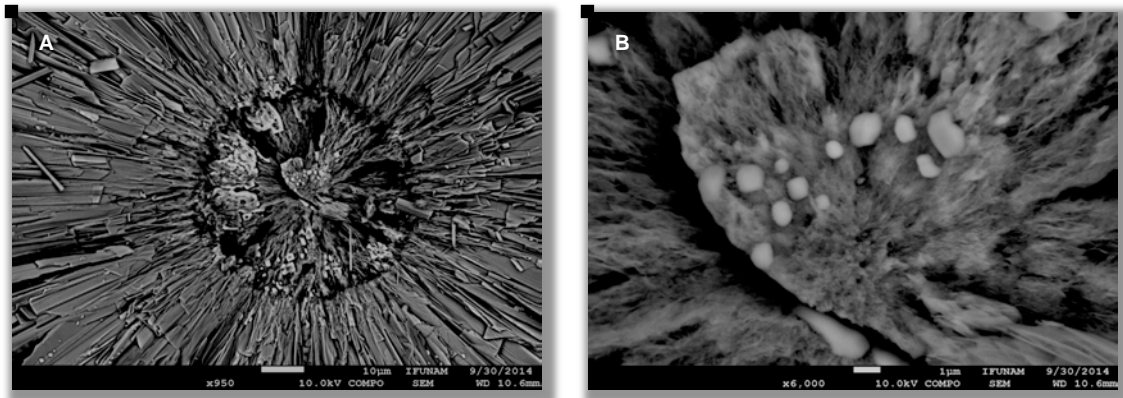


Fig. 5. FESEM por electrones retrodispersados de CEMP1-A + pCAP. Se aprecia distinta homogenicidad mineral del núcleo, las estructuras depositadas sobre el, están bien delimitadas y agrupadas.

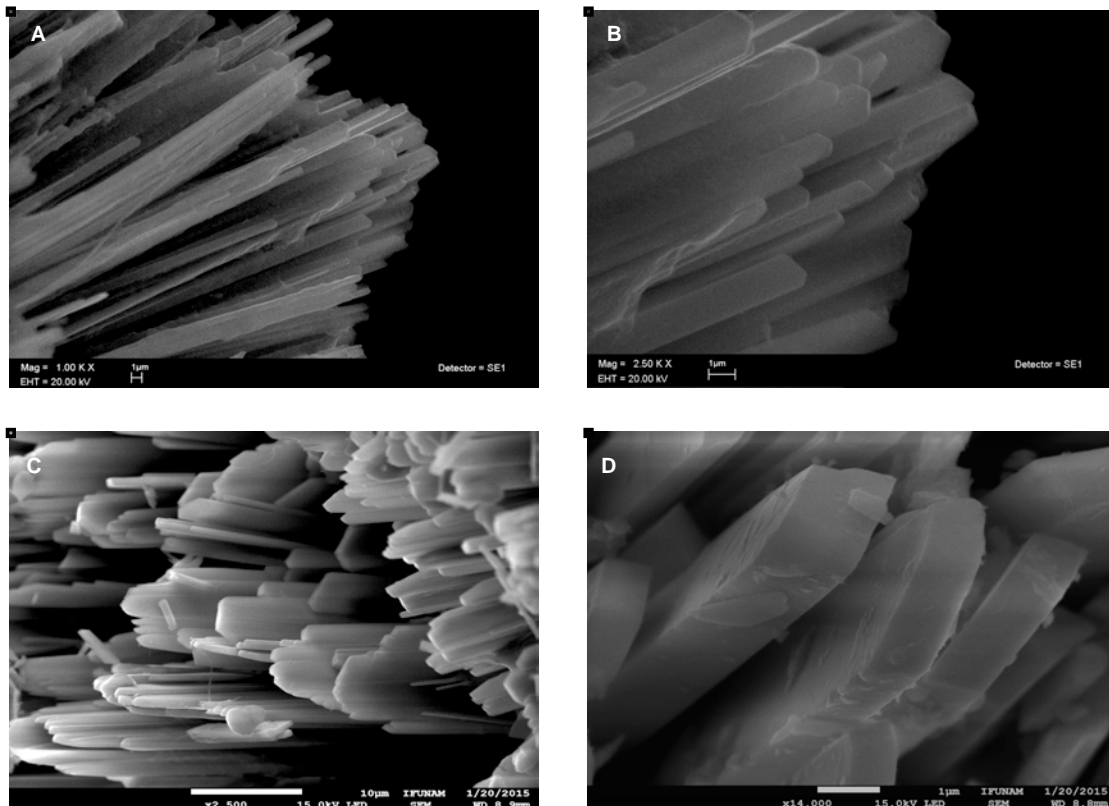


Fig. 6. Microfotografía FESEM por electrones secundarios, las prolongaciones de CEMP1-A (A,B) y pCAP (C,D) presentan diferente tamaño, forma y grosor cada una, por una posible interacción del péptido sobre la cara b-axial, provocando un menor diámetro de las mismas (A,B).

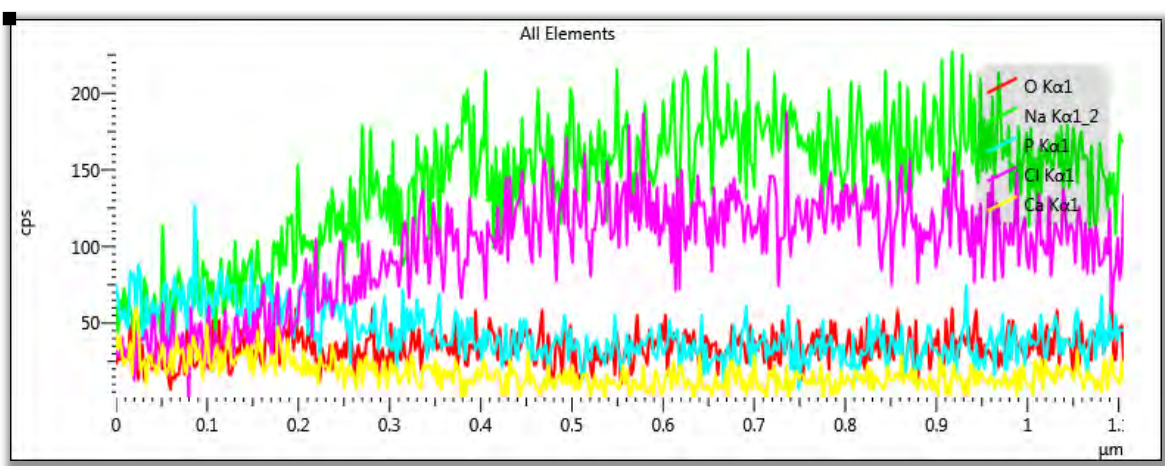
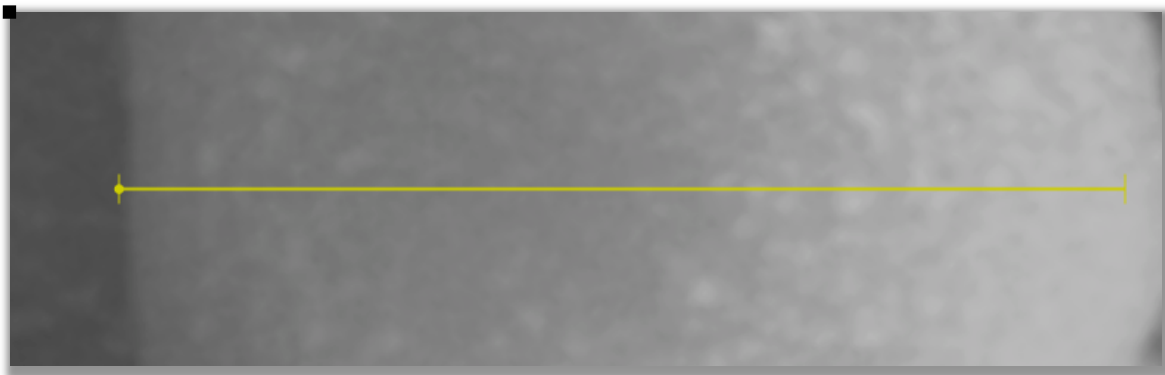
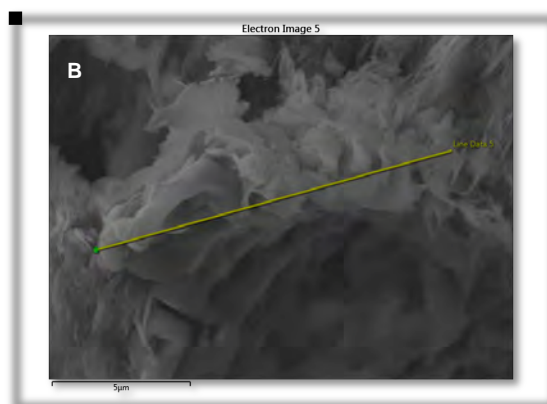
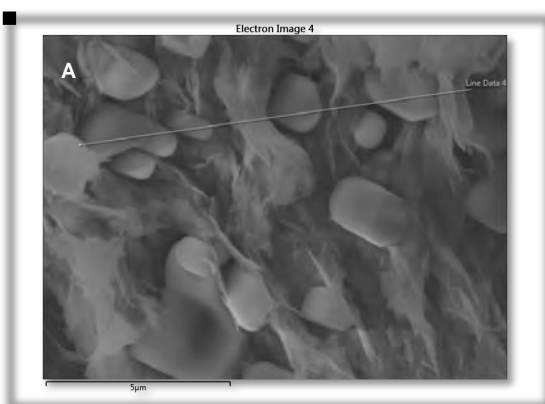


Fig. 7. Análisis químico elemental en línea de CEMP1-A + pCAP. Aumento en la concentración de Na y Cl, estos son elementos presentes durante la síntesis de los cristales en el sistema de contradifusión.



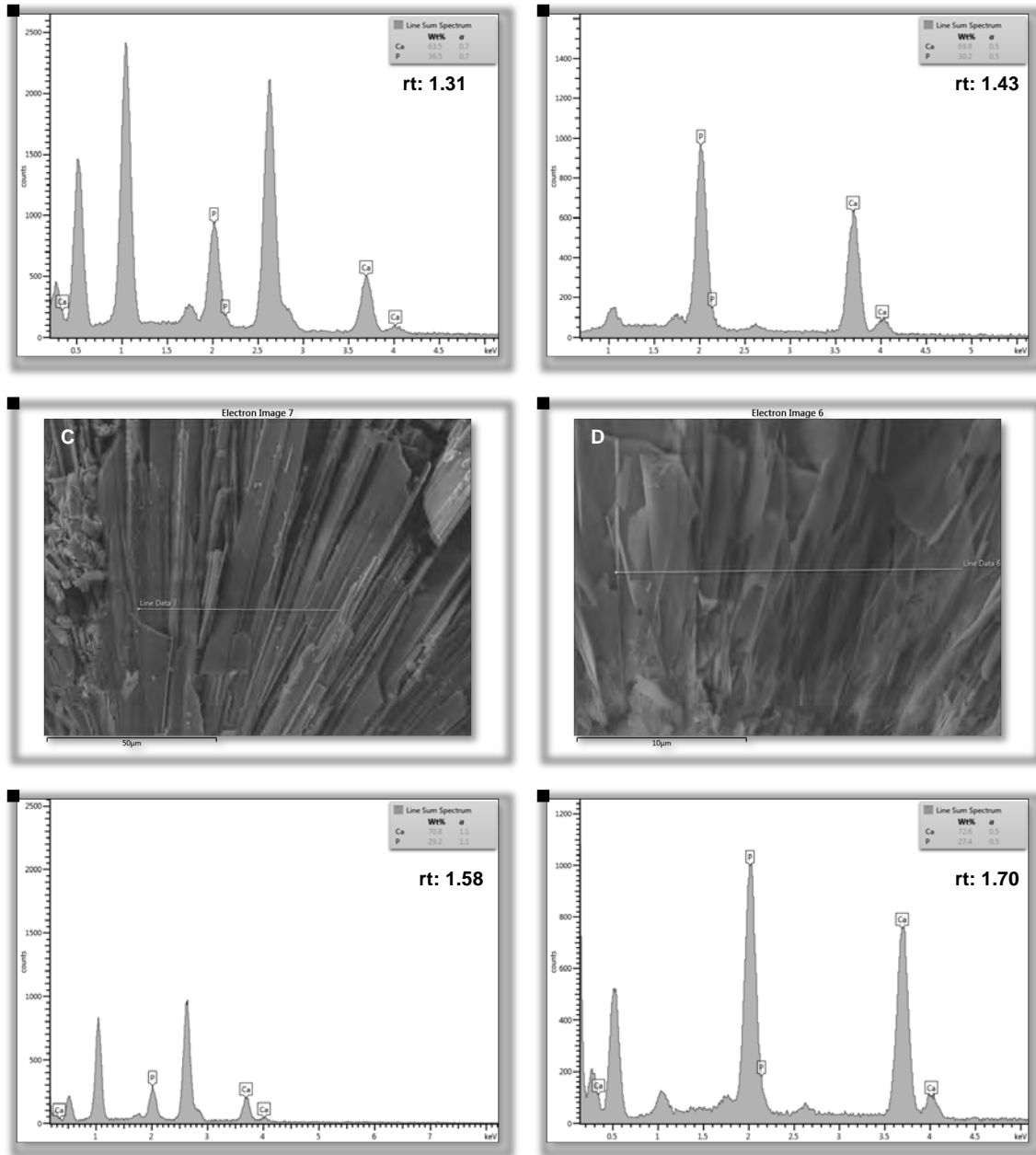


Fig. 8. Análisis químico elemental por SEM, realizado en el interior de una esférula interior-exterior, a través de una línea mostrada en las figuras A,B,C y D. El análisis EDS determinó distintas zonas con grados de mineralización diferentes. En la parte interna un rt Ca/P 1.31 reflejando una fase mineral inmadura y en la parte externa de 1.70 correspondiente a HAp.

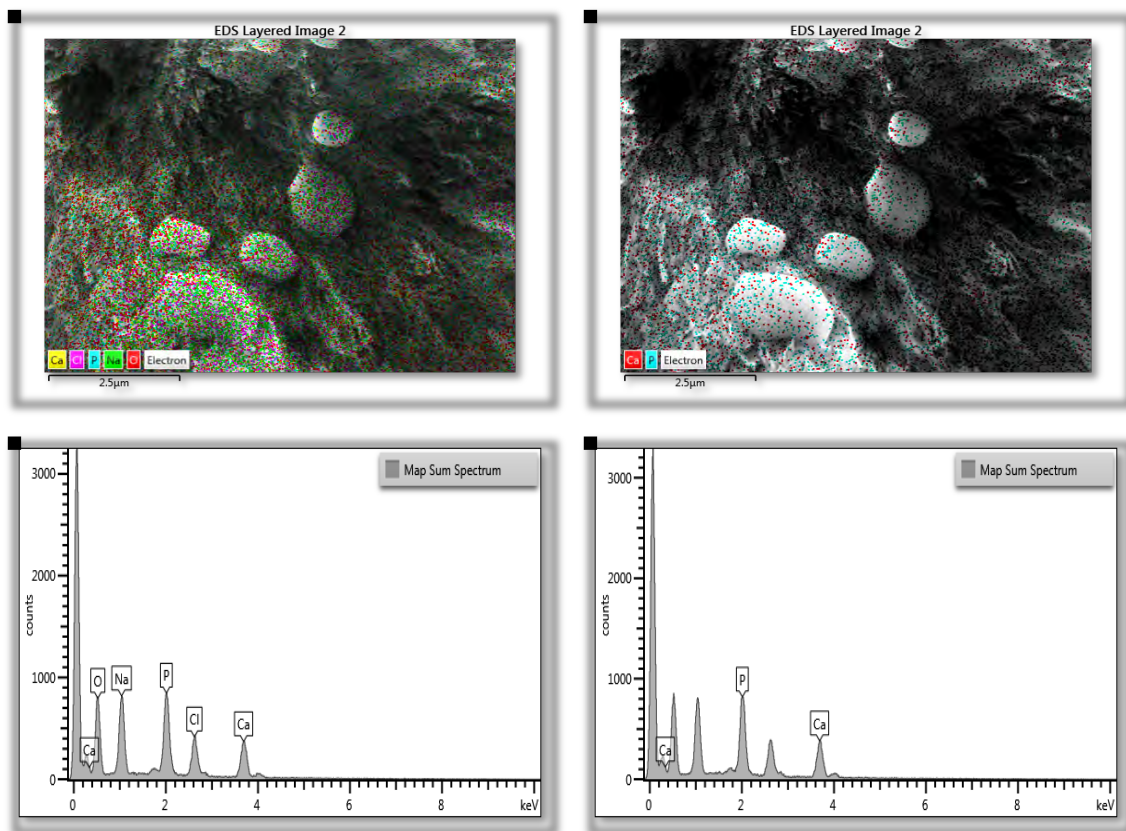
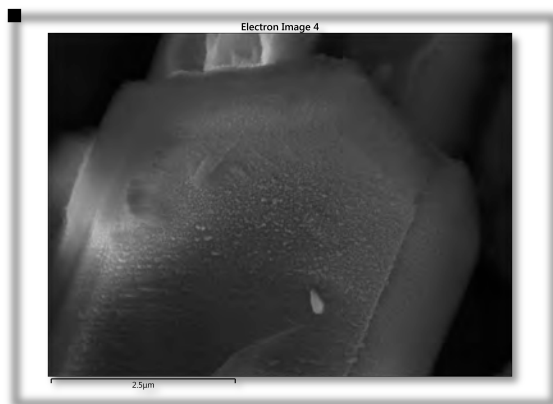
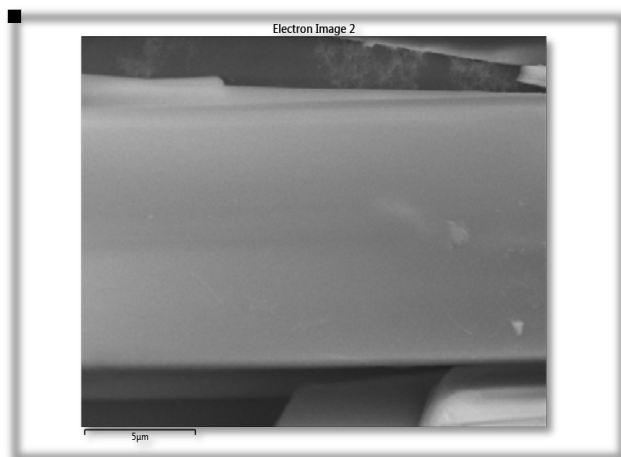


Fig. 9. Mapeo de elementos por EDS de CEMP1-A+pCAP. Por medio de un análisis puntual, es apreciable la diversidad de elementos en la muestra donde el Na, Cl y P se encuentran en mayor abundancia respecto a Ca.



Element	Atomic %
P	36.58
Ca	63.42
Total:	100.00

Fig. 10. Composición química de la muestra CEMP1-B+pCAP con rt Ca/P: 1.73.



Element	Atomic %
P	39.01
Ca	60.99
Total:	100.00

Fig. 11. Composición química de la muestra pCAP donde la relación rt Ca/P: 1.56, fase mineral correspondiente a HAp.

Ca/P	Nombre	Fórmula	Acrónimo
2.0	Fosfato Tetracálcico	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	TetCP
1.67	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}\text{O}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	OHAp
	Fosfato de Calcio Amórfo	$\text{Ca}_{10-x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	ACP
1.50	Fosfato Tricálcico(α,β,γ)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	TCP
1.33	Fosfato Octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_5\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	OCP
1.0	Fosfato Dicálcico Dihidratado	$\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	DCPD
1.0	Fosfato Dicálcico	Ca_2HPO_4	DCPA
1.0	Pirofosfato de Calcio(α,β,γ)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	CPP
1.0	Pirofosfato de Calcio Dihidratado	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	CPPD
0.7	Fosfato Heptacálcico	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	HCP
0.67	Fosfato Tetracálcico Dihidratado	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	TDHP
0.5	Fosfato Monocálcico Monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	MCPM

	CEMP1-A	CEMP1-B	CEMP1-A +CEMP1-B	pCAP	pCAP +CEMP1-A	pCAP +CEMP1-B
rt Ca/P	1.38	1.16	1.29	1.56	1.80	1.73

Tabla 1. En la parte superior, las diferentes fases minerales determinadas como rt Ca/P. En la parte inferior se muestran las relaciones Ca/ P respectivas para cada péptido de forma individual y combinada.

En la tabla 1, pCAP mostró la misma capacidad nucleadora de cristales de HAp que la proteína HACD1/CAP, sin embargo al combinar los péptidos pCAP+CEMP1-A aumentó considerablemente el rt Ca/P a 1.80, por otro lado CEMP1-B presenta rt de 1.16 y al combinarlo CEMP1-B+pCAP demostró tener una propiedad antagonizante al disminuir con un rt 1.70, sin embargo esta cualidad antagonizante es insuficiente para el potencial que demuestra el pCAP.

CEMP1-A fue capaz de nuclear cristales de OCP con un rt 1.38, esta es una fase mineral previa a la HAp y al combinar CEMP1-A+CEMP1-B disminuyó a 1.29.

A partir de estos resultados se decidió corroborar la fase mineral correspondiente a cada muestra mediante Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM), determinando las distancias interatómicas para conocer la fase mineral de los cristales obtenidos y relacionarla con el análisis semicuantitativo que ofrece la técnica de EDS. Esto es posible gracias a la comparación de nuestros resultados con tablas cristalográficas internacionales para asegurar la fase mineral correspondiente (Fig. 12).

Se obtuvieron valores representativos en cuatro muestras, al encontrar distancias interatómicas de pCAP+CEMP1-A de 2.72 Å, 2.68 Å y 2.67 Å, correspondientes a los planos cristalinos (-10-1), (-10 0), (0 0 1) con su eje de zona [0-10], para pCAP+CEMP1-B una distancia interatómica de 2.85 Å, 6.20 Å y 6.89 Å con los planos (211), (101), (101) y un eje de zona de [-111], pCAP refleja los planos cristalinos (211), (110) y (201) con su eje de zona [-221].

Mediante la tabla PDF #860740 se determinó la fase mineral de HAp, mientras que los planos cristalinos de CEMP1-B fueron (111), (101) y (111) con distancias interatómicas de 3.71 Å, 6.36 Å y 3.45 Å correspondientes a fosfato de calcio hidratado, analizado en la tabla cristalográfica PDF#821943.

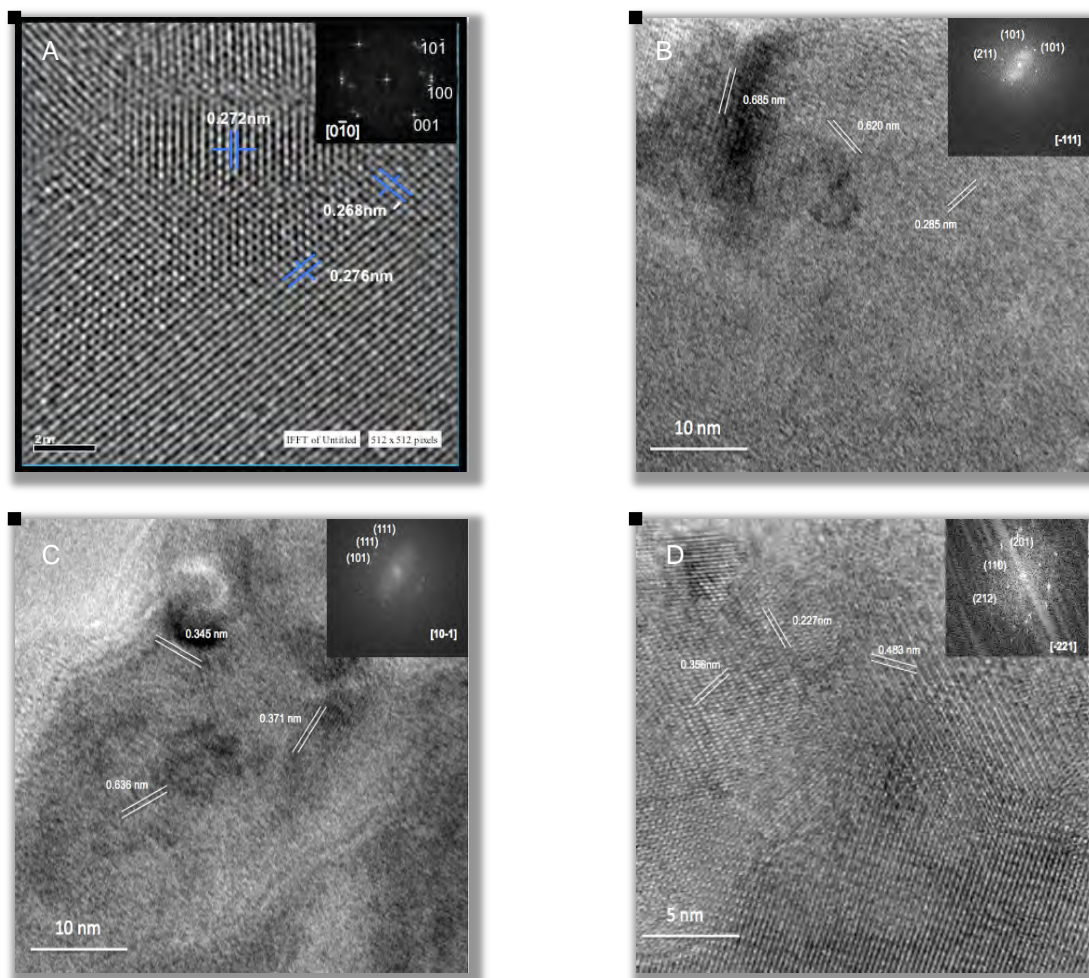


Fig. 12. Imágenes de HRTEM donde se muestran los planos cristalinos de las muestras (A) CEMP1-A+pCAP, (B) pCAP+CEMP1-B, (C) CEMP1-B y (D) pCAP. En la parte superior derecha la Transformada de Fourier para determinar los planos cristalinos (en parentesis) y eje de zona (en corchetes).

El espectro de μ RAMAN se obtuvo al enfocar el laser por medio del objetivo 100x en un microscopio Olympus confocal con espectro Raman por medio de un sistema de imagen, logrando identificar y delimitar el haz del laser con tiempos de exposición de 2,8,12 y 15 segundos realizando 12 lecturas por muestra, en las cuáles se encontraron una importante interacción de grupos vibracionales HPO_4^{3-} en un modo de frecuencia ν_1 , ν_2 , ν_3 , ν_4 en longitudes de $1000\text{-}900\text{cm}^{-1}$, $954\text{-}957\text{ cm}^{-1}$, $419\text{-}423\text{ cm}^{-1}$, $584\text{-}589\text{ cm}^{-1}$ y 1044cm^{-1} para el grupo control. Un

modo vibracional P-O-H y P-O-C en 1089 cm^{-1} , Si-O-Si en $1008\text{-}1010\text{ cm}^{-1}$, $185\text{-}187\text{ cm}^{-1}$ para O-CH₃ y $1106\text{-}1108\text{ cm}^{-1}$ por una fuerte interacción de grupos aromáticos.

Frecuencia cm^{-1}	Función del modo vibracional	Estructura
1000-900	Estiramiento simétrico	$\nu_1 \text{HPO}_4^{3-}$
954-957	Estiramiento simétrico	$\nu_2 \text{HPO}_4^{3-}$
419-423	Estiramiento simétrico	$\nu_3 \text{HPO}_4^{3-}$
584-589	Estiramiento asimétrica	$\nu_4 \text{HPO}_4^{3-}$
1044	Estiramiento asimétrico	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ no apatita
1089	Estiramiento	P-O-H y P-O-C
185-187	Vibración torsional CH ₃	O-CH ₃
1106-1108	Estiramiento C-C	Interacción entre grupos aromáticos

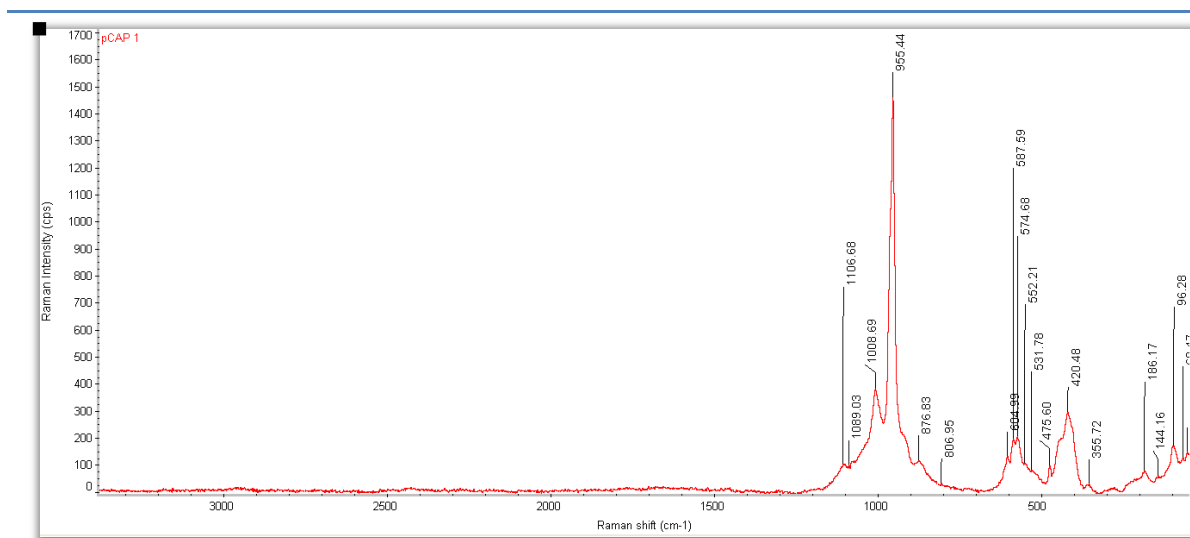


Fig. 13. Análisis por μ RAMAN de pCAP, destacando la fuerte interacción del grupo aromático en la frecuencia 1106 cm^{-1} , en el modo vibracional 186 cm^{-1} representativo del silicato, un grupo en 955 cm^{-1} característicos de los iones PO_4^{3-} y representativos de la HAp.

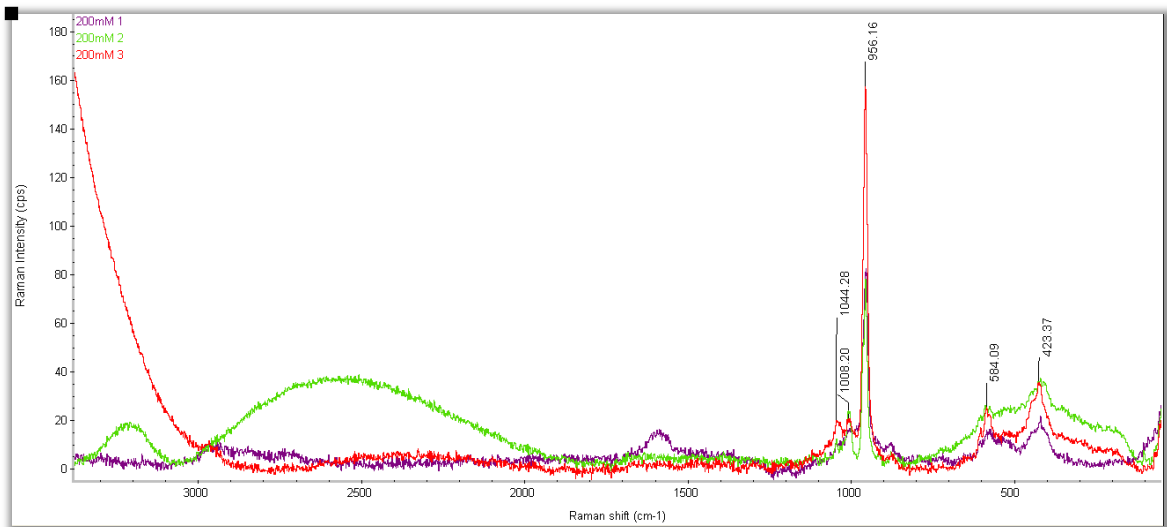


Fig. 14. Análisis por μ RAMAN del control negativo (sin péptido) donde solo se encuentra el grupo fosfato 956 cm^{-1} , en 1044 cm^{-1} un grupo fosfato no apatita, sin embargo la intensidad en número de cuentas refleja un material con baja cristalinidad.

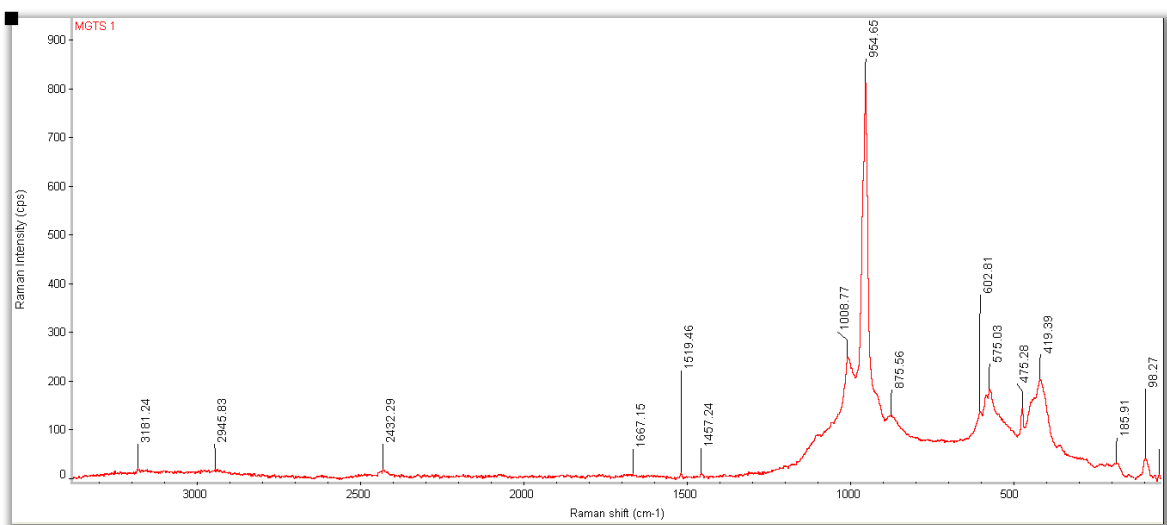


Fig. 15. Análisis por μ RAMAN de CEMP1-A con presencia del grupo fosfato en 954 cm^{-1} sin embargo la intensidad de 900 cps lo relaciona con la fase mineral de OCP obtenido a través de EDS.

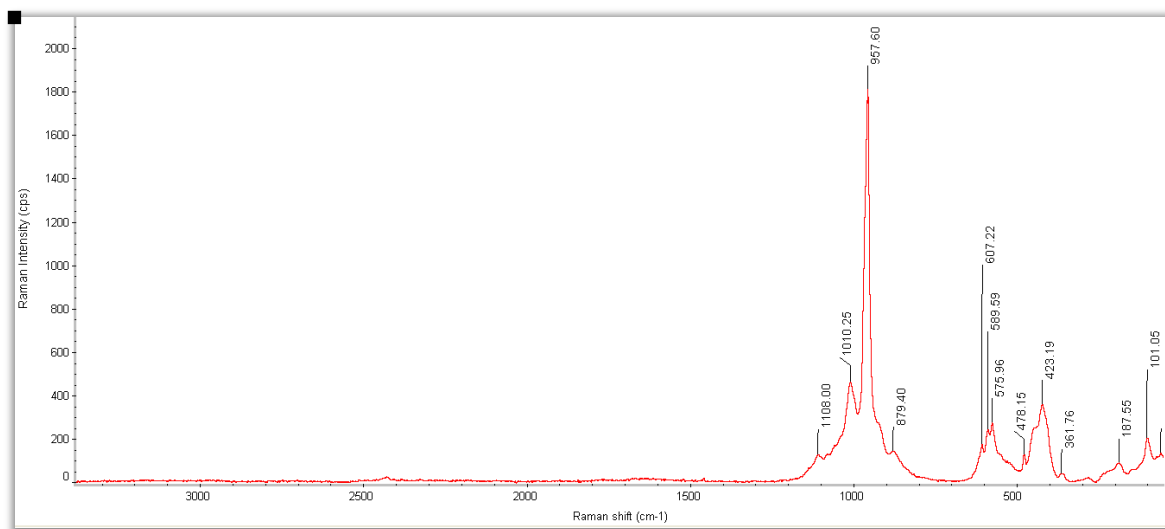


Fig. 16. Análisis por μ RAMAN de pCAP+CAMP1-A, donde se observa la interacción de grupos aromáticos en 1108 cm^{-1} correspondiente a la fenilalanina, el grupo fosfato característico a 957 cm^{-1} y un numero de 2000 cps, mayor que el obtenido con el pCAP.

Discusión

Actualmente algunas proteínas descritas en el proceso de auto ensamblaje y formación de biominerales son la fosfoserinas⁽⁸⁵⁾ y amelogenina⁽⁸⁶⁾, las cuáles participan en la mineralización de la apatita, siendo la organización de nano estructuras la llave actual para llegar a diseñar materiales de integración con avanzadas funciones y lograr comprender el proceso de biomineralización, como los cristales sintetizados por las proteínas del cemento HACD1/CAP y CEMP1 bajo sistemas de contradifusión en gel de metasilicato se ha observado la capacidad nucleadora de cristales de fosfato de calcio^(87,88). La nucleación de cristales de HAp *de novo* es acelerada por ciertos nucleadores y algunas macromoléculas específicas de la matriz extracelular, de la misma forma se entiende que las proteínas ácidas no colágenas tienen un papel importante en la deposición de apatita aunque el proceso de cristalización no esta comprendido

en su totalidad^(89,90) por lo que una de las mayores diferencias entre la apatita del esmalte y la HAp mineral es la presencia del 3 wt %(peso total) de CO_3^{2-} en la superficie del esmalte⁽⁹¹⁾. Esto tiene relevancia en nuestra investigación al observar distintas fases de mineralización obtenidas por EDS durante el proceso de nucleación, los datos observados en la figura 8 muestran un procesos similar obtenido con la fosfoproteína DMP1, una de las proteínas nucleadoras de HAp con un punto isoeléctrico teórico de 3.95, que esta presente en la matriz de la dentina y el hueso, además de participar en la regulación durante la mineralización ósea y dentinaria, en la que es evidente la formación de estructuras del orden de nanómetros, con fases amorfas llegando a ser precursores de crecimiento del eje c durante la orientación de cristales de HAp^(89,90), además de enriquecer el trabajo al utilizar secuencias específicas de aminoácidos para identificar dominios funcionales y su afinidad a la HAp donde el dominio ubicado en el extremo carboxilo terminal fue el responsable de la nucleación de apatita, además se mostró una fuerte unión al calcio (determinado bajo ensayos de unión a Ca), en este estudio postula la formación de clústers ácidos teniendo un importante papel en el reconocimiento de la superficie mineral⁽⁸⁹⁾. Nosotros mostramos que al combinar pCAP con los péptidos de CEMP1 fueron observadas esférulas con amplias prolongaciones por la posible capacidad de captar iones calcio formando oligómeros o iniciar el crecimiento de cristalización de la apatita además de formar estructuras similares a la proteína nativa, concluyendo que los dominios ácidos forman estos clústers conformando particulares diseños moleculares que participan en el control y orientación de los cristales de fosfato de calcio orientados en el eje c. Compartimos la idea que el uso de dominios funcionales lo que permite la interacción entre las secuencias, ensamblaje y alineamiento de Clúster de Posner para la formación de bloques de apatita⁽⁸⁵⁾.

pCAP presenta 3 aminoácidos fenilalanina, distribuidos a lo largo del péptido, al ser un aminoácido hidrofóbico presenta una fuerte unión y afinidad a la HAp^(91,92), tiene la capacidad de donar un electrón a la superficie de la HAp a

través de su anillo aromático, además de aminoácidos que participan en el proceso de fosforilación como la treonina, serinas, tirosina y prolina, similar a la estaterina salival que presenta 43 aminoácidos de prolina, tirosina y rica en fosfopéptidos, ubicada en la saliva de glándulas submandibulares, teniendo secuencias aminoacídicas con sitios de fosforilación importantes y que probablemente interaccionen como activadores o inhibidores de la nucleación de cristales de fosfato de calcio en cavidad oral. La estructura se ha estudiado en Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido (NMR), NMR en estado de solución y en dicroísmo circular permitiendo observar su capacidad de unión a la HAp. Gracias a sitios de fosforilación en sus dos primeras serinas y un grupo de cadenas aromáticas (fenilalanina) se ha identificado que estos grupos aromáticos están involucrados en la interacción con la HAp⁽⁹¹⁾. Recientemente se han encontrado procesos que propagan diversas vías de cristalización, gracias al estudio de mesocristales que permite la comprensión de auto ensamblado y nano estructurado, logrando obtener un perfecto alineamiento y desarrollo de caras y planos cristalinos, construyendo unidades parecidas a sistemas inorgánicos en donde la DL-alanina a partir de soluciones supersaturadas de agua/alcohol propician la precipitación de elementos nano estructurados y perfectamente ensamblados con morfología similar a agujas, por lo que pensamos que este aminoácido podría estar vinculado en el ensamblaje y ordenamiento de los cristales hexagonales de la HAp. Por otro lado, existen estudios donde la adición de amelogenina induce un incremento en el tamaño de cristales y ratio del fosfato octacálcico^(93,94), se piensa que esto se debe a una fuerte interacción de la amelogenina con la cara (010) del cristal de fosfato octacálcico, que además tiene la capacidad de inhibir su crecimiento en la dirección b-axial y favorece el crecimiento de cristales más delgados. Se ha concluido que la absorción de moléculas orgánicas, aminoácidos, polímeros y agentes quelantes sobre caras preferenciales cristalográficas provocan interacciones con iones Ca^{2+} que modulan y favorecen el crecimiento cristales de fosfato de calcio (fig.12)^(95,96). También la secuencia acídica que presenta la

Proteína Fosfoforina Dentinaria (DPP) rica en Asp-Ser ⁽⁹⁷⁾, presenta una asociación importante.

A pesar que se han realizados numeroso intentos para llegar a emular la cristalización de fosfatos de calcio *in vitro*, no se logrado desarrollar un sistema *in vivo*, ya que no es posible que por una simple mezcla de soluciones que contengan los iones calcio y fosfato pueda dirigir una rápida precipitación formando cristales de formas inespecíficas e irregulares, sin embargo el sistema de contradifusión que empleamos en esta investigación nos permitió conocer el potencial y morfologías de los cristales producidos por los péptidos de modo individual y al combinarlos, lograr compararlos entre ellos permitiendo una síntesis de las esfeérulas mucho más rápida y simple, desarrollando cristales de fosfato de calcio, en tamaño de nano escala, con morfología típica de agujas y permitir la obtención de imágenes con sus respectivas pruebas de análisis químico. El gel de difusión es un método sencillo para la síntesis de formas cristalinas de fosfato de calcio de gran tamaño en 2 dimensiones ^(98, 99,100), Iijima y Moriwaki ⁽¹⁰¹⁾ usaron el método de difusión por gel de polimetacrilamida para sintetizar cristales de OCP a 37°C y pH 6.5-7.4 similar al rango permitido por el amortiguador HEPES (pH 6.8-8.2) empleado en nuestra investigación. Existen factores generales en este procedimiento como la temperatura y el pH, que son indispensables para modular el tamaño y distribución de los cristales ^(87,88,96), aunque el crecimiento de cristales se lleva acabo por un proceso de precipitación de sales, el tamaño y distribución de los cristales no puede ser controlada por los diversos parámetros de reacción efectuados en el sistema logrando solo emular un medio fisiológico con pH de 7.2 y una temperatura de incubación a 37°C permitiendo el crecimiento de cristales de HAp. Algunos investigadores consideran que un pH inicial bajo induciendo una alta solubilidad de cristales de fosfato de calcio entre la fase estable y metaestable las cuáles son indispensables para conducir la maduración y crecimiento de los cristales de HAp a lo largo de su eje c ⁽¹⁰²⁾. Se ha reportado que la presencia de EDTA/ácido cítrico, ácido tartárico, ácido acético pueden funcionar como ligandos complejos

para inhibir el crecimiento a lo largo de la dirección cristalina [001] y [100] ayudando a la formación de nano partículas con forma de agujas ⁽¹⁰³⁾, ya que se tiene bien descrito que el uso de de proteínas, aminoácidos y polímeros, son empleados como mejor opción para la síntesis formas cristalinas de Ca/P en 2-D en especial para el desarrollo de HAp.

En la tabla 1 se muestra el importante papel que tiene pCAP en la nucleación de cristales de HAp similares otros estudios en los que emplearon la proteína recombinante, la cuál presentaba una alta capacidad para la nucleación de cristales de HAp, sin embargo, dentro de la secuencia de CEMP1 se identificaron péptidos que podrían tener un efecto antagonizante ó promotor en la nucleación de cristales de fosfatos de calcio. Este potencial nucleador desarrollado por CEMP1-A sintetizando cristales de fosfato octacálcico e inhibitorio al mismo tiempo desarrollado por el péptido CEMP1-B es similar al de la OPN, involucrada en el proceso de regulación mineral fisiológica y patológica⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾, abundante en fluidos fisiológicos supersaturados especialmente en el oxalato de calcio presente en cálculos renales⁽¹⁰⁷⁾, en placas ateroscleróticas^(108,109) y en algunos tejidos blandos con una probable interacción antagónica de procesos de calcificación distrófica⁽¹¹⁰⁾. Estudios *in vitro* ya han marcado la importancia de la OPN como un potente inhibidor en la formación *de novo* de HAp⁽¹¹¹⁻¹¹³⁾ sin embargo se han identificado dominios aminoacídicos así como residuos de ácido aspártico DDDDDDDDD en un modelo de rata y en humanos DDEDDDD⁽¹¹⁴⁾, residuos conservados Ser junto a otras regiones con capacidad de ser fosforiladas y desfosforiladas favoreciendo la interacción, regulación, nucleación y crecimiento de cristales de HAp⁽¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾. Se piensa que esta propiedad esta relacionada con la presencia de grupos fosfato, grupos carboxilato y cargas negativas para desarrollar un potencial inhibitorio en la formación de HAp, por lo que pensamos y sugerimos que este potencial inhibitorio podría tener un papel importante para futuras investigaciones terapéuticas donde se necesite contrarrestar un efecto patológico mineralizante.

Por otro lado, se ha sugerido que el correcto ordenamiento de grupos fosfato en fosfoserinas son necesarios para facilitar la nucleación de cristales de HAp, sobre la cara preferencial (100) en el plano ab, permitiendo su crecimiento en la dirección c-axis ⁽¹¹³⁾, esta afinidad es atribuida a la extensa conformación y cambios conformacionales de laminas- β , donde las interacciones intermoleculares facilitan la formación de puentes de calcio con grupos fosfato y aspartato, generando un incremento en grupos con carga negativa e interactuando de modo ordenado con la cara preferencial de unión a la HAp.

En un estudio realizado por Iijima *et al.* demostraron que las combinaciones de las proteínas enamelinina y la amelogenina facilitan el crecimiento cristalino de OCP en nano capas, provocando una inhibición de crecimiento sobre la dirección c-axis, mientras que la dirección b-axis presentó un incremento en su relación Ca/P (longitud, anchura y grosor), favoreciendo el aumento en el potencial de la amelogenina para desarrollar cristales de mayor tamaño ⁽⁹²⁾. Este potencial es similar al encontrado al combinar pCAP y CEMP1-A observados en la figura 3 (A, B, C, D) donde es evidente el aumento en grosor y tamaño de los cristales obtenidos, por lo que hipotetizamos que el péptido está teniendo preferencia por el eje c-axis provocando un sinergismo al combinarlos provocando un mayor potencial de nucleación de cristales de HAp y maduración a dicha fase cristalina los 7 días posteriores a la incubación.

Sabemos que los parámetros de red de la HAp es ($a = 0.95$ nm y $c = 0.68$ nm) con una simetría hexagonal de $P6_3/m$ y su celda unitaria está dispuesta a lo largo de su eje c, por lo que podríamos justificar una orientación preferencial dando lugar a un crecimiento ordenado a lo largo de este eje provocando la morfología de los cristales obtenidos en forma de barras en las muestras pCAP, y una forma variable en las combinaciones de pCAP+CEMP1-A y pCAP+CEMP1-B. Se ha comprobado que esta es una característica importante como un posible biomaterial ya que tendrá una directa interacción con el hueso logrando un aumento en la biocompatibilidad, bioactividad y osteoconductividad, sin embargo, como se mostró en la tabla 1, dentro de este estudio microanalítico

se pretende llegar a un valor aproximado de la relación Ca/P y compararlos con valores estequiométricos obtenidos para la relación Ca/P de la HAp siendo este de alrededor de ± 1.6 , sin embargo existen numerosas formas de fosfatos de calcio dependientes de su rt Ca/P otorgándoles una característica mineral independiente (tab. 1). Conocer la estrecha relación entre rt Ca/P, acidez y solubilidad, por lo tanto mientras menor es el rt Ca/P, más grande es la acidez y la solubilidad, cuando encontramos un rt Ca/P < 1 , la acidez y la solubilidad son extremadamente altas y ambos parámetros disminuyen paulatinamente para rt Ca/P cercanos a 1.67, el cuál es característico de la HAp estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ⁽¹¹³⁾.

El análisis por μRAMAN permitió identificar importantes grupos funcionales, los cuáles respaldan nuestros datos obtenidos por medio de FE-SEM y HR-TEM sobre la fase mineral que presentan nuestras muestras. Un punto indispensable para determinar el grado de cristalinidad que presentan nuestras muestras son el número de cuentas (cps), grosor e intensidad de las bandas mostradas en las Fig. 13, 14, 15, 16 ya que cuando esta banda se encuentra más delgada y mayor número de cps nuestro material refleja mayor grado cristalinidad como los observados en pCAP (± 1540), pCAP+CEMP1-A (± 2000) y CEMP1-A (± 850) en comparación a la muestra control (± 170). Se lograron identificar diversos grupos funcionales importantes dentro los que destacan grupos vibracionales HPO_4^{3-} en un modo de frecuencia ν_1 , ν_2 , ν_3 , ν_4 relacionado a un estiramiento simétrico característico por la formación de un tetraedro de átomos de oxígeno que rodean al átomo de fósforo. Se ha observado la frecuencia ν_1 HPO_4^{3-} en una región espectral de $1000\text{-}900\text{cm}^{-1}$ presentándose como un pico delgado de $954\text{-}957\text{cm}^{-1}$, esta banda casi siempre va acompañada por picos con diferente número de ondas, probablemente de la frecuencia ν_2 HPO_4^{3-} en la región de $419\text{-}423\text{cm}^{-1}$, con un modo de flexión asimétrica en la frecuencia ν_4 bajo la onda $584\text{-}589\text{cm}^{-1}$ ⁽¹¹⁸⁾, la región de estiramiento asignado en P-O-H en 1089 cm^{-1} así como otro estiramiento en P-O-C, además de un pico a 1044cm^{-1} en el grupo control reflejando un grupo ν_3 PO_4^{3-} no apatita, el grupo silicato puede ser asignado

entre 1008 y 1010 cm^{-1} debido a una tensión asimétrica vibracional del grupo Si-O-Si (silicato y oxígeno) por la gran carga iónica entre Si-O ⁽¹¹⁹⁾. 185-187 cm^{-1} por una vibración torsional CH₃ del grupo funcional metilo O-CH₃ característico de la cadena lateral de la alanina, valina y leucina en lugar de uno de dos α Hidrógenos, al ser moléculas de naturalidad hidrófoba, probablemente estén queden incluidas en los clústers formados al interaccionar los iones Ca²⁺ y PO₄, esta característica es evidente en las muestras con péptido y ausente en el control. La frecuencia de 1106-1108 cm^{-1} refleja una alta interacción de grupos aromáticos presentes en las muestras de pCAP y pCAP+CEMP1-A posiblemente del modo vibracional estiramiento C-C de la fenilalanina.

A pesar de existir posiciones atómicas ya reportadas en la literatura como las distancias entre P-O, Ca-O y O-H pueden ser variables dependiendo de los módulos de relajación e interface atómicas

Conclusión

El sistema de contradifusión en gel de metasilicato, es un importante sistema que nos permite la identificación de proteínas o péptidos con actividad nucleadora de cristales de fosfato de calcio, sin embargo el pH, la temperatura, las condiciones de hipersaturación, tiene un papel muy importante durante la síntesis de cristales. Este sistema permitió un crecimiento de cristales con tamaño aproximado a 400 a 500 μm con una concentración de 150 μg de péptido en un tiempo de 7 días, esto fue posible gracias al Microscopio Electrónico de Barrido por Emisión de Campo se identificó la homogeneidad superficial que presentan nuestras muestras, apoyandonos con técnicas semicuantitativas para conocer los elementos químicos que la constituyen, como el EDS, mapeo de elementos y análisis en línea, los cuáles permitieron identificar a pCAP como un potente nucleador de cristales de HAp Lo relevante en esta investigación fue que en la ceal realizar la combinación de pCAP+CEMP1-A, ya que además de constituir cristales más grandes, la fase

mineral indicaba un rt Ca/P superior a 1.7, un perfecto ensamblado y formación de ángulos en el eje c y el plano (001), con diámetros en cada una de sus prolongaciones de 9-14 μm y un grosor aproximado a 2.5 μm , indicando una fuerte interacción con la celda unitaria de la HAp. Se identificaron importantes cambios morfológicos los que podrían adentrarnos sobre las caras preferenciales cristalinas de cada péptido sobre la HAp sintetizando prolongaciones delgadas en forma de agujas o varillas y otras con morfología similar a corbatas o escamas.

CEMP1-B, presenta un potencial antagónico para los cristales fosfato octacálcico que ofrece CEMP1-A, con un rt Ca/P 1.27 al combinarlos y de manera individual un rt Ca/P 1.16 posiblemente por interacción hacia una cara preferencial sobre los ejes c y b, esta característica podría ser sometida a futuras investigaciones como un posible inhibidor de cristales de fosfato de calcio en diversas patologías donde exista un incremento en el metabolismo óseo.

La nucleación heterogénea es otra característica presentada en nuestros cristales, al identificar una forma con características de un núcleo, donde se desprenden las prolongaciones cristalinas, desarrollando distinto nivel de madurez, siendo menor en el centro rt Ca/P 1.31 con elementos químicos como Cl, Na y mayor en la superficie rt Ca/P 1.70 perdiendo elementos traza durante su síntesis y aumentando los niveles Ca y P.

El espectro μRaman refleja material con un alto grado de cristalinidad para pCAP, pCAP+CEMP1-A y pCAP+CEMP1-B, con grupos HPO_4^{3-} en diversos modos vibracionales, además de una fuerte interacción de cadenas aromáticas, esto indica que el acoplamiento de aminoácidos como la fenilalanina, capaz de formar clústers de calcio y permitir el acoplamiento y ensamblado de los iones Ca^{2+} sobre el eje c, interaccionando aminoácidos con carga ácida durante su crecimiento y acoplamiento en el eje c.

HR-TEM es una técnica empleada para observar e investigar la microestructura

de interface de una muestra, su función es como una huella dactilar que permite el reconocimiento de su fase mineral a través de planos cristalinos formados por la distancias interatómicas y correlacionarlos con tablas cristalográficas ya establecidas, fueron obtenidas distancias entre los puntos atómicos ± 0.620 nm a 0.689 nm para el eje mayor y de ± 0.272 nm a 0.345 nm para el eje menor los cuáles son correspondientes para los espaciamentos atómicos reportados para la HAp.

Se propone el diseño de un modelo en dinámica molecular que permita identificar los posibles arreglos moleculares que sufren los péptidos y su interacción con las planos cristalinos de la HAp, esto podría ampliar el panorama del proceso de síntesis de cristales, desarrollando un proceso de biomineralización más rápido y efectivo para una futura aplicación terapéutica.

Bibliografía

1. Iwata T, Yamato M, Ishikawa I, Ando T, Okano T. Tissue Engineering in periodontal tissue. The Anatomical Recor. 2014; 297:16-25.
2. Fermin A. Carranza. CARRANZA'S CLINICAL PERIODONTOLOGY. Saunders Elsevier 2014, 11th edition.
3. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. Periodontol 2000, 1997; 13:91-120.
4. Pitaru S, McCulloch CA, Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. J Periodontal Res 29, 1994; (2):81-94.
5. Cho M, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. Periodontol 2000, 2000 Oct; 24:9-27.
6. McCulloch CAG. Progenitor cell populations in the peri- odontal ligament of mice. Anat Rec, 1984; 211: 258-262.
7. McCulloch CAG. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. Periodontol 2000, 1993; 1: 16-25.

8. McCulloch CAG, Nemeth E, Lowenberg B, Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat Rec*, 1987; 219: 233–242.
9. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*, 2006; 40:11-28.
10. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000*, 1997; 13:91-120.
11. Shantipriya R. Essentials of Clinical Periodontology and Periodontics. aypee Brothers Medical Publishers, 2010. New edition.
12. Nanci A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol*, 1999; 126(3):256-69.
13. Schoroeder HE. Handbook of microscopic anatomy. Vol. 5. The periodontium. Berlin: Springer-Verlag, 1989.12-323.
14. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy of diseased periodontal tissues. *Periodontology 2000*, 2006; 40: 29-49.
15. Nakae H, Narayanan AS, Raines E, Page RC. Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum. *Biochemistry*, 1991; 20: 7047-7052.
16. Bosshardt DD, Selving KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000*,1997; 13: 41-75.
17. Arzate H, Zeichner M, Mercado G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontology 2000*, Vol. 67, 2015. 211–233.
18. Glimcher MJ. Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat Rec* 1989; 224: 139–153.
19. Vidal BC, Mello MLS, Valdrighi L. Histochemical and an- isotropical aspects of the rat cementum. *Acta Anat* 1974; 89: 546–559.
20. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology 2000*, 2003; 24: 73-98.
21. Bartold PM and Narayanan AS. Biology of the periodontal connective tissue. Quitessence Publishing CO, Inc. 1998 Carol Stream, Illinois, USA.

22. Garant PR. Oral Cells and tissues. Quintessence Books Chapter 7: Root formation and cementogenesis. Quintessence Publishing Co, Inc 2003.
23. Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. Crit Rev Oral Biol Med 2002; 13: 474–484.
24. Miki Y, Narayanan AS, Page RC. Mitogenic activity of cementum components to gingival fibroblasts. J Dent Res 1987; 66: 1399–1403.
25. Yonemura K, Narayanan AS, Miki Y, Page RC, Okada H. Isolation and partial characterization of a growth factor from human cementum. Bone Miner 1992; 18: 187–198.
26. Narayanan AS, Ikezawa K, Wu D, Pitaru S. Cementum specific components which influence periodontal connective tissue cells. Connect Tissue Res 1995; 33: 19–21.
27. Slavkin H.C., and Boyde A. (1975). Cementum: An epithelial secretory product? *J. Dent. Res* 53,157.
28. Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: Cementogenesis revisited. Periodontology 2000. 2006; 41: 196-217.
29. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. Histología y embriología bucodental. Capítulo 4. Editorial médica panamericana. España 1999.
30. Bonucci E. Calcification in biological systems. Florida Estados Unidos. CRC press 1992.
31. Bosshardt DD, Zalzal S, McKee MD, Nanci A. Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. Anat Rec 1998; 250: 13–33.
32. Nanci A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. J Struct Biol 1999; 126: 256–269.
33. Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. Cell Biol Int 1994; 18: 617–628.
34. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. Matrix Biol 2000; 19: 615–622.
35. 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. 217.

36. MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Piotrowski B, Somerman MJ. Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Res* 1995; 33: 1–7.

37. Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J Biol Chem* 1988; 263: 19430–19432.

38. Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8562–8565

39. Akisaka T, Gay CV. The plasma membrane and matrix vesicles of mouse growth plate chondrocytes during differentiation as revealed in freeze-fracture replicas. *Am J Anat* 1985; 173: 269–286.

40. Moss DW, Eaton RH, Smith JK, Whitby LG. Association of inorganic-pyrophosphatase activity with human alkaline-phosphatase preparations. *Biochem J* 1967; 102:53–57.

41. Hauschka, P.V., Lian, J.B., Gallop, P.M. Direct identification the calcium binding amino acid-carboxyglutamate, in mineralized tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73. 1975; 1447–1451.

42. Cole, D.E., Hanley, D.A. *Osteocalcin In Bone Matrix and Bone Specific Products*. CRC Press, London, UK. Hall, B.K.1991; 239–294.

43. Hauschka, P.V., Lian, J.B., Cole, C., Gundberg, C.M. Osteocalcin and MGP: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol. Rev.* 1989; 69: 990–1047.

44. Price PA, Williamson MK. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem* 260. 1985; 14971–14975.

45. Cole DE, Hanley DA. Osteocalcin. In: Hall BK, editor. *Bone matrix and bone specific products*. London, UK: CRC Press, 1991: 239–294.

46. Hashimoto F, Kobayashi Y, Kobayashi ET, Sakai E, Kobayashi K, Shibata M, et al. Expression and localization of MGP in rat tooth cementum. *Archives of Oral Biology* 2001;46(7):585–92.

47. Price PA, Urist MR, Otawara Y. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1983; 18: 1400–1407.

48. Luo G, D'Souza R, Hogue D, Karsenty G. The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development. *J Bone Miner Res.* 1995; 10: 325–334.

49. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature.* 1997; 386: 78–81.

50. Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP, Van Maldergem L, Ziereisen F, Yuksel B, et al. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet.* 1999; 21 : 142 –144.
51. Goiko M, Dierolf J, Gleberzon J, Liao Y, Grohe B, Harvey A. Goldberg^{2,3}, John R. de Bruyn¹, Graeme K. Hunter. Peptides of Matrix Gla Protein Inhibit Nucleation and Growth of Hydroxyapatite and Calcium Oxalate Monohydrate Crystals. *PLOS ONE.* 2013. Vol 8.
52. Canfield AE, Farrington C, Dziobon MD, Boot-Handford RP, Heagerty AM et al. The involvement of matrix glycoproteins in vascular calcification and fibrosis: an immunohistochemical study. *J Pathol.* 2002; 196: 228-234.
53. Wu D-Y, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan SA. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment. *J Bone Mineral Res.* 1999; 11: 686-692.
54. Saito M, Iwase M, Maslan N, Nozaki N, Yamamuchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Terenaka T, Narayanan S. Expression of cementum-derived attachment protein in bovin tooth germ during cementogenesis. *Bone.* 2001; 29: 242-248.
55. Arzate H, Olson SW, Page RC, Narayanan S. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture. *Bone and mineral Res* 1992; 18: 15-30.
56. Montoya G. Estudio de cristales inducidos con el péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) en un sistema libre de células. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. Fac. Odon. 2014; 16-17.
57. Valdes de Hoyos A, Hoz Rodriguez L, Arzate H, Narayanan AS. Isolation of protein-tyrosine phosphatase-like member a variant from cementum. *J Dent Res.* 2012; 91 (2): 203-9.
58. Arzate H, Jiménez-García LF, Alvarez Perez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human Cementoblastoma-conditioned Medium-derived Protein . *FASEB J.* 1992; 6 (11): 2990-5.
59. Pitaru S, Pritzki A, Bar-Kana I, Grosskopf A, Savion N, Narayanan AS. Bone morphogenetic protein 2 induce the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *Connect Tissue Res.* 2002; 43: 254-64.
60. Komaki M, Kang M, Narayanan AS, Role of MAPK kinases p42^{erk-2} / p44^{erk-1} in cementum-derived attachment-protein-mediated cell attachment. *J Dent Res.* 2000; 79: 1789-1793.
61. Liu W, Y Cao, J. Shen, Q. Xu, Z. Zhu and Q Li. [Design and evaluation of a kind of biomimetic peptides of dentin matrix protein-1]. *West China Journal of Stomatology.* 2013; 31: 4.

62. Álvarez-Pérez MA, Nayaran S, Zeichner-David M, Carmona-Rodriguez B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP23). *Bone* 2006; 38: 409-419.

63. Romo Arévalo E, Arzate H, Montoya Ayala G, Rodríguez Romero A. High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum protein 1 lectin activity. *FEBS Lett.* 2016; 590(1):129-138.

64. Janeth Serrano, Enrique Romo, Mercedes Bermúdez, A. Sampath Narayanan, Margarita Zeichner-David, Leticia Santos, Higinio Arzate. Bone regeneration in rat critical-size defects induced by cementum protein 1 (CEMP1). *PLoS ONE.* 2013; 8(11).

65. Romo-Arevalo, E. et al. *In vitro* effects of cementum protein 1 (CEMP1) on calcium phosphate crystal formation and its role during the mineralization process. *MRS online proceedings library* 1244. 2009.

66. Pérez A. Efecto biológico de un péptido de la proteína del cemento 1 (CEMP1) en el proceso de diferenciación de células derivadas del ligamento periodontal humano. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. Fac. Odon. 2014; 55-59.

67. Bermúdez M. Uso de microarreglos de expresión para determinar el papel biológico de CEMP1. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. Fac. Odon. 2014; 69.

68. Kim J, Arola DD, Gu LS, et al. Functional biomimetic analogs help remineralize apatite-depleted demineralized resin-infiltrated dentin *via* a bottom-up approach. *Acta Biomater.* 2010; 67:2740–2750.

69. Gu LS, Kim YK, Liu Y, et al. Immobilization of a phosphonated analog of matrix phosphoproteins within cross-linked collagen as a templating mechanism for biomimetic mineralization. *Acta Biomater.* 2011;71:268–277.

70. Gungormus, M., E. E. Oren, J. A. Horst, H. Fong, M. Hnilova, M. J. Soreman, M.L. Snead, R. Samudrala, C. Tarmerler, and M. Sarikay. Cementomimetics-constructing a cementum-like biomineralized microlayer via amelogenin-derived peptides. *Int J Oral Sci.* 2012; 4 (2): 69-77.

71. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003; 24:4385–4415.

72. Scheufler C, Sebald W, Hulsmeier M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol* 1999; 287:103–115.
73. Saito A, Suzuki Y, Ogata S, Ohtsuki C, Tanihara M. Activation of osteoprogenitor cells by a novel synthetic peptide derived from the bone morphogenetic protein-2 knuckle epitope. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1651:60–67.
74. Chen Y, Webster T. Increased osteoblast functions in the presence of BMP-7 short peptides for nanostructured biomaterial applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2008; 295-304.
75. Xueping Lv, Yang Yang, Sili Han, Danxue Li, Huanxin Tu, Wei Li, Xuedong Zhou, Linglin Zhang. Potential of an amelogenin based peptide in promoting remineralization of initial caries. *Archives of Oral Biology*. 2015; 60 (10):1482-1487.
76. Mendoza Torres E, Oyarzú A, Mondaca-Ruff D, Azocar A, Castro PF, Jalil JE, Chiong M, Lavander S, Ocaranza MP. ACE2 and vasoactive peptides: novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2015; (4): 217-37.
77. Makras P, Delaroudis S, Anastasilakis AD. Novel therapies for osteoporosis. *Metabolism*. 2015; (10):1199-214.
78. Zhu L., P. Hwang. H. E. Witkowska, H. Liu, and W. Li. Quantitatively and kinetically identifying binding motifs of amelogenin proteins to mineral crystals through biochemical and spectroscopic assays. *Methods Enzymol*. 2013; 532: 327-41.
79. Silverman L, Boskey A. Diffusion systems for evaluation of biomineralization. *Calc Tissue Int*. 2004; 75: 494-501.
80. Garcia-Ruiz JM. Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Methods Enzymol*. 2003; 368: 130-54.
81. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J*. 1996; 317: 59-64.
82. F. Otalora, J.A. Gavira, J.D. Ng, J.M. Garcia-Ruiz, Prog. Counterdiffusion methods applied to protein crystallization. *Biophys. Mol. Biol*. 2009; 101(1-3): 26-37
83. Y. Suzuki, K. Tsukamoto, I. Yoshizaki, H. Miura, T. Fujiwara. Correction of the equilibrium temperature caused by slight evaporation of water in protein crystal growth cells during long-term space experiments at International Space Station. *Cryst. Growth Des*. 2015: 86(8).
84. Gavira J.A. Current trends in protein crystallization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2015; 585. George, A., Sabsay, B., Simonian, P. A. & Veis, A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *J. Biol. Chem*. 1993; 268: 12624–12630.

85. Treboux, G., Layrolle, P., Kanzaki, N., Onuma, K. & Ito, A. Symmetry of Posner's cluster. *J. Am. Chem. Soc.* 2000; 122: 8323–8324.
86. Koutsopoulos, S.; Dalas, E. Inhibition of Hydroxyapatite Formation in Aqueous Solutions by Amino Acids with Hydrophobic Side Groups. *Langmuir*. 2000; 16: 6739–6744.
87. Guo X, Yan H, Zhao S, Li Z, Li Y, Liang X. Effect of calcining temperature on particle size of hydroxyapatite synthesized by solid-state reaction at room temperature. *Adv Powder Technol* 2013; 24: 1034–8.
88. Loo S, Siew Y, Ho S, Boey F, Ma J. Synthesis and hydrothermal treatment of nanostructured hydroxyapatite of controllable sizes. *J Mater Sci. Mater Med* 2008; 19: 1389–97.
89. Xiao S, et al. Dentinogenesis imperfecta 1 without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSSP. *Nature Genet.* 2001; 27: 201–204.
90. Kinney J.H. et al. Intrafibrillar mineral maybe absent in dentinogenesis imperfecta type II. *Dent. Res.* 2001; 80: 1555–1559.
91. Gibson J, Popham J, Raghunathan V, Stayton P, Drobny G. A Solid-State NMR Study of the Dynamics and Interactions of Phenylalanine Rings in a Statherin Fragment Bound to Hydroxyapatite Crystals. *J. AM. CHEM.* 2006; 128 (16): 5364– 5370.
92. Iijima M, Moriwaki Y, Takagi T, Moradian-Oldak J. Effects of bovine amelogenins on the crystal morphology of octacalcium phosphate in a model system of tooth enamel formation. *J Cryst Growth.* 2001; 222: 615–26.
93. Wang Y, Hassan MS, Gunawan P, Lau R, Wang X, Xu R. Polyelectrolyte mediated formation of hydroxyapatite microspheres of controlled size and hierarchical structure. *J Colloid Interface Sci.* 2009; 339: 69–77.
94. Montoya G, Arenas J, Romo E, Zeichner-David M, Alvarez M, Narayanan AS, Velázquez U, Mercado G, Arzate H. Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. *Bone.* 2014; 69: 154–64.
95. Villarreal-Ramírez E1, Moreno A, Mas-Oliva J, Chávez-Pacheco JL, Narayanan AS, Gil-Chavarría I, Zeichner-David M, Arzate H. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): primary role in biomineralization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 19: 384(1) :49–54.
96. Kandori K, Mizumoto S, Toshima S, Fukusumi M, Morisada Y. Effects of heat treatment of calcium hydroxyapatite particles on the protein adsorption behavior. *J Phys Chem B* 2009; 113: 11016–22.
97. Sekar C, Kanchana P, Nithyaselvi R, Girija EK. Effect of fluorides (KF and NaF) on the growth of dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) crystal. *Mater Chem Phys.* 2009; 115: 21–7.

98. García-Ruiz, J.M. Counter-diffusion methods for macromolecular crystallisation. *Methods Enzymol.* 2003; 368: 130-154.
99. Low, B.W., Richards, F.M. Measurement of the density, composition and related unit cell dimensions of some protein crystals. *J. Am. Chem. Soc.* 1954: 76.
100. García-Ruiz, J.M., Otalora, F., Novella, M.L., Gavira, J.A., Sauter, C., Vidal, O. A supersaturation wave of protein crystallisation. *J. Crystal Growth.* 2001: 232.
101. Moradian-Oldak, J. Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biol.* 2001; 20: 293–305.
102. Razzouk S, Brunn JC, Qin C, Tye CE, Goldberg HA, Butler WT. Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation, are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion. *Bone.* 2002; 30: 40.
103. Iijima M, Fan D, Bromley K, Sun Z, Moradian J. Tooth enamel proteins enamelin and amelogenin cooperate to regulate the growth morphology of octacalcium phosphate crystals. *Crystal growth design.* 2010; 10: 4815-4822.
104. Chen NX, Moe SM. Hemodialysis session: The perfect storm for vascular calcification. *J Investig Med* 2006; 54: 380.
105. Asselman M, Verkoelen CF. Crystal-cell interaction in the pathogenesis of kidney stone disease. *Curr Opin Urol.* 2002; 12: 271.
106. Giachelli CM. Ectopic calcification: new concepts in cellular regulation. *Z Kardiol* 2001; 90: 31.
107. Miller SJ, Watson WC, Kerr KA, Labarrere CA, Chen NX, Deeg MA, Unthank JL. Development of progressive aortic vasculopathy in a rat model of aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293: 634.
108. Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* 1994; 300: 723.
109. Schlieper G, Westenfeld R, Brandenburg V, Ketteler M. Inhibitors of calcification in blood and urine. *Semin Dial* 2007; 20: 113.
110. Pampena DA, Robertson KA, Litvinova O, Lajoie G, Goldberg HA, Hunter GK. Inhibition of hydroxyapatite formation by osteopontin phosphopeptides. *Biochem J* 2004; 378: 1083.
111. Ito S, Saito T, Amano K. *In vitro* apatite induction by osteopontin: interfacial energy for hydroxyapatite nucleation on osteopontin. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 69: 11.
112. Christensen B, Nielsen MS, Haselmann KF, Petersen TE, Sorensen ES. Osteopontin is cleaved at multiple sites close to its integrin-binding motifs in milk and is a novel substrate for plasmin and cathepsin D. *Biochem J.* 2005; 390: 285.

113. Furedi-Milhofer H, Moradian-Oldak J, Weiner S, Veis A, Mintz KP, Addadi L. Connect Tissue Res 1994;30:251. [PubMed: 7956204].
114. Xin R, Ren F, Leng Y. Synthesis and characterization of nano-crystalline calcium phosphates with EDTA-assisted hydrothermal method. Mater Des. 2010; 31: 1691–4.
115. Gashti MP, Stir M, Hulliger J. Synthesis of bone-like microporous calcium phosphate/iota-carrageenan composites by gel diffusion. Colloids Surf B. 2013; 110: 426–33.
116. Iijima M, Moriwaki Y. Lengthwise and oriented growth of octacalcium phosphate crystal in polyacrylamide gel in a model system of tooth enamel apatite formation. J Cryst Growth. 1998; 194: 125–32.
117. Dana D. Medina and Yitzhak Mastai. Synthesis of dl-Alanine Mesocrystals with a Hollow Morphology. Crystal Growth & Design. 2008; 8 (10): 3646–3651.
118. Kirchner MT. Ancient and modern specimens of human teeth: A Fourier transform Raman spectroscopic study. J Raman Spectrosc. 1997; 28: 171–178.
119. K. Nakamoto. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. 5th edn, Wiley, New York. 1997.
120. Han GS, Lee S, Kim DW, Kim DH, Noh JH, Park JH, et al. A simple method to control morphology of hydroxyapatite nano- and microcrystals by altering phase transition route. Cryst Growth Des. 2013; 13: 3414–8.
121. Stetler-Stevenson, W. G. & Veis, A. Bovine dentin phosphophoryn: calcium ion binding properties of a high molecular weight preparation. Calc. Tissue Int. 1987; 40: 97–102.
122. Mizutani Y, Hattori M, Okuyama M, Kasuga T, Nogami M. Large-sized hydroxyapatite whiskers derived from calcium tripolyphosphate gel. J Eur Ceram Soc 2005; 25: 3181–5.
123. Wen HB, Moradian-Oldak J, Fincham AG. Dose-dependent modulation of octacalcium phosphate crystal habit by amelogenins. J Dent Res. 2000; 79: 1902–6.
124. J.D. Ng, J.A. Gavira, J.M. Garcia-Ruiz, J. Protein crystallization by capillary counterdiffusion for applied crystallographic structure determination. Struct. Biol. 2003; 142(1): 218–31.
125. Rosenthal AK, Gohr CM, Uzuki M, Masuda I. Osteopontin promotes pathologic mineralization in articular cartilage. Matrix Biol 2007; 26: 96.
126. Weiss, I. M., Tuross, N., Addadi, L. & Weiner, S. Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. J. Exp. Zool. 2002; 293: 478–491.
127. Boskey, A. L. The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1991; 2: 369–387.

128. Aoki H. Medical applications of hydroxyapatite. Tokyo, St. Louis: Ishikayu Euro America Inc. 1994.