



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE UN PÉPTIDO DERIVADO DE LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 Y SU APLICACIÓN TERAPÉUTICA *IN VIVO*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M en C RODRIGO CORREA PRADO

TUTORES:

DR. HIGINIO ARZATE

LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL

DR. JESÚS ÁNGEL ARENAS ALATORRE

INSTITUTO DE FÍSICA

CIUDAD DE MEXICO, FEBRERO

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi madre. Eres sin duda la mujer que más admiro y amo. Por ser la más valiente y decidida, por tu amor, apoyo incondicional, gracias por darme lo mejor de ti, por tu tiempo y estar a mi lado apoyándome en todas las decisiones que han cruzado en mi vida. Nadie como tú para mostrarme con una mirada y con una sonrisa, ternura infinita para calmar mis tristezas y darme siempre una nueva esperanza. Por ser como eres y por tu amor sin límites, siempre mi mayor ejemplo.

Para mi hermosa familia, por su apoyo incondicional, consejos y tiempo durante toda mi trayectoria escolar. Tengo que agradecer especialmente a Reina Prado por tu cariño y amor incondicional tía, a lo largo de mi trayectoria de vida.

Para mis profesores Dr Higinio Arzate, Dr Jesús Ángel Arenas Alatorre, Dr. Eric Mauricio Rivera Muñoz, por su gran apoyo, confianza y desempeño académico durante mi formación.

Para mis compañeros de laboratorio Fabiola, Mikado, Enrique, Lía, Gonzalo, Mary, Sonia, Alí, Lupita, Rita, Clau y Pao. Por todos este tiempo juntos y una amistad incondicional, que sigamos cosechando éxito en cada paso profesional y personal.

Gracias por el apoyo técnico y docente brindado 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, también a el **I.Q Iván Puente Lee** por su apoyo brindado en TEM y SEM en el Instituto Mario Molina. Por su apoyo incondicional con imágenes de AFM a el **Ing. Carlos Flores Morales** y al Instituto en Investigaciones en Materiales. Gracias a la **Dra Beatriz Marcela Millán Malo** por su apoyo con el análisis por Difracción de Rayos X y a la **Dra. Carmen Leticia Peza Ledesma** en el uso del Microscopio de Fluorescencia de Rayos X e Infrarrojo en el **Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada UNAM/Juriquilla**.

Gracias a la **U.N.A.M, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, Facultad de Odontología, Instituto de Física, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada UNAM/Juriquilla** y apoyo **CONACyT** por mostrar confianza en este proyecto, fomentar la investigación y educación en México.

*Para mis hijas Camila y Tamara: Mi más grande inspiración.
Gracias mis pequeñas princesas por demostrarme su amor, confianza y apoyo infinito. Por no
soltarme, impulsarme y SIEMPRE creer en mí.*

*“Porque nadie se cruza en tu camino por casualidad, no te arrepientas de nada
y aprende.. La gente buena te da felicidad, la mala te da lecciones y la
maravillosa te da recuerdos”.*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
MARCO TEÓRICO	8
REGENERACIÓN PERIODONTAL.....	8
REGENERACIÓN ÓSEA.....	9
CEMENTO RADICULAR.....	10
COMPOSICIÓN MINERAL.....	11
COMPOSICIÓN ORGÁNICA.....	11
PROTEÍNAS NO COLÁGENAS	12
FIBRINECTINA.....	12
SIALOPROTEÍNA ÓSEA.....	12
OSTEOPONTINA.....	13
OSTEOCALCINA.....	14
FOSFATASA ALCALINA.....	14
PROTEÍNA DEL CEMENTO 1.....	15
PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO (CAP).....	17
FACTORES DE CRECIMIENTO DERIVADOS DEL CEMENTO.....	19
UTILIDAD DE PÉPTIDOS EN LA REGENERACIÓN PERIODONTAL.....	21
PÉPTIDO DE LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1-p3).....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
METODOLOGÍA	27
SÍNTESIS DEL PÉPTIDO CEMP1-p3.....	27
PREDICCIÓN DE UN MODELO TRIDIMENSIONAL <i>IN SÍLICO</i>	27
ENSAYO DE CRECIMIENTO POR TITULACIÓN CONSTANTE.....	27
SISTEMA DE CONTRADIFUSIÓN <i>IN VITRO</i>	28
DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ	28
CARACTERIZACIÓN DE CRISTALES DE FOSFATO DE CALCIO POR DIVERSAS TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	29
CULTIVO CELULAR.....	31
EFFECTO DEL PÉPTIDO DE CEMP1 EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	31
ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA.....	31
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MINERALIZACIÓN.....	32
RT-PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL qRT-PCR.....	32
ANÁLISIS POR WESTERN BLOT	32
ESTUDIO <i>IN VIVO</i>	33
PROCEDIMIENTOS HISTOLÓGICOS Y ANÁLISIS EN LA REGENERACIÓN ÓSEA.....	34
INMUNOFLUORECENCIA.....	34
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	75

ABREVIATURAS

Proteína del Cemento 1 (CEMP1)
punto isoeléctrico (pI)
kilodaltones (kDa)
Hidroxiapatita (HAp)
Fosfato Octacálcico (OCP)
Magnesio (Mg)
Flúor (F)
Azufre (S)
Cobre (Cu)
Zinc (Zn)
Sodio (Na)
Calcio (Ca)
Fósforo (P)
Osteopontina (OPN)
Osteonectina (SPARC)
Sialoproteína ósea (BSP)
Osteocalcina (OCN)
Albúmina (Alb)
Inmunoglobulina G (IgG)
Vitronectina (VN)
RGD (arginina-glicina-asparagina)
factor de crecimiento fibroblástico (FGF)
factor de crecimiento transformante β (TGF β)
factor de crecimiento tipo insulínico (IGF-I y II)
proteínas morfogenéticas de hueso (BMP's)
factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)
factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF-5)
Fosfatasa Alcalina (TNAP)
fosfato inorgánico (Pi)
Proteína de Adhesión del Cemento (HACD1/CAP)
Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)
Nitrato de Calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)
Cloruro de Sodio (NaCl)
Fosfato Sódico Na_2HPO_4
HEPES 2-[4-(β -hidroxietil)piperazin-1-yl] acid etanosulfónico)
Mililitros (ml)
Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo; (FESEM)
kilovoltaje (KV)
Microscopía Electrónica de Transmisión por Alta Resolución (HRTEM)
Transformada Rápida de Fourier (FFT)
Células del Ligamento Periodontal Humano (HuPLCs)
Cloruro de cetilpiridinio (CPC).
Rojo de Alizarina (ARS)
Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)
Difracción de Rayos X (XRD)

RESUMEN

Actualmente el uso de péptidos sintéticos se basa en el desarrollo de compuestos que puedan mimetizar las funciones que desarrolla una proteína recombinante, identificando dominios sus funcionales para con la finalidad de reducir limitaciones financieras, tiempo y complejidad al encontrarse con un sistema inmunológico con la capacidad de producir una respuesta no deseada en la terapia que buscamos. Recientemente, la proteína CEMP1 ha demostrado tener un importante papel en el proceso de mineralización y se han identificado algunas secuencias peptídicas de la proteína que tienen la capacidad de emular el papel que desempeña la proteína recombinante. Sin embargo, poco se sabe sobre las diferentes características químicas, morfológicas y biológicas sobre estos péptidos. En este estudio fueron evaluadas las características físico-químicas, topográficas y espectroscópicas de un péptido de la proteína del Cemento 1 (CEMP1-p3 *in vitro*, su aplicación en un modelo animal y análisis.

Nuestros resultados indican que el péptido CEMP1-p3 es una molécula de 20 aminoácidos, con un punto isoeléctrico de 8.1, soluble en amortiguadores fisiológicos y un peso molecular teórico de 1.98 kDa. La predicción *in silico* de su modelo tridimensional indica que presenta dos regiones de estructura aleatoria situados a los extremos terminales y una region de estructura en alfa hélice en la parte central. El péptido es termoestable, además promueve el crecimiento y nucleación de policristales predominando la fase mineral de Fosfato Octacálcico que eventualmente madurará a Hidroxiapatita *in vitro* a una concentración de 20 µg. El resultado de las pruebas *in vitro* realizados en defectos de tamaño crítico sobre calvarias de ratas tratadas con el péptido CEMP1-p3 en un andamio de gelatina, fué la nueva formación de hueso posterior al día 30 y 60 de la colocación del péptido, con un 60 y 80 % de regeneración del defecto respectivamente.

Estos datos muestran que CEMP1-p3 es una molécula bioactiva eficaz para la regeneración de tejido óseo. La aplicación de este péptido bioactivo puede llevar a implementar nuevas estrategias para la regeneración ósea.

ABSTRACT

Actually the use of synthetic peptides is based on the development of compounds that can mimic the functions development by a recombinant protein, identifying their functional domains in order to reduce financial limitations, time and complexity when encountering an immune system with the ability to produce an unwanted response in the therapy we seek. Recently, CEMP1 protein has demonstrated an important role in the mineralization process and some peptide sequences of the protein have been identified that have the ability to emulate the role that the native protein plays. However, little is known about the different chemical, morphological and biological characteristics peptide's. In this study, the chemical, microscopic and spectroscopic characteristics of a synthetic peptide of CEMP1 (CEMP1-p3) *in vitro*, its application in an animal model and analysis.

Our results suggest that CEMP1-p3 is a molecule of 20 amino acids, with an isoelectric point of 8.1, soluble in physiological buffers and a theoretical molecular weight of 1.98 kDa. The *in silico* prediction of its three dimensional model indicates that it has two regions of random structure located at the extremus and an alpha helix region in the central part. The peptide is thermoestable also promotes the growth and nucleation of polycrystals, predominating the mineral phase of Octacalcium Phosphate that will eventually mature to Hydroxyapatite *in vitro* at a concentration of 20 µg. The result of *in vivo* experiments performed on critical size defects on calvaria of rats treated with peptide CEMP1-p3 in a gelatin scaffold was the new bone formation after 30 and 60 days of peptide placement, with a 60 and 80 % of defect regeneration respectively.

These data demonstrate that CEMP1-p3 is an effective bioactive molecule for bone tissue regeneration. The application of this bioactive peptide may lead to implementing new strategies for the regeneration of bone.

MARCO TEÓRICO

REGENERACIÓN PERIODONTAL

La enfermedad periodontal comprende una amplia gama de afecciones inflamatorias que afectan las estructuras de soporte de los dientes (encía, hueso, ligamento periodontal y cemento) , lo que podría conducir a la pérdida dental e inflamación sistémica. El inicio y propagación de la enfermedad periodontal es a través de una disbiosis de la microbiota oral (biopelícula) , que luego interactúa con el sistema inmunológico, llevando al paciente a un proceso inflamatorio y posteriormente a la enfermedad periodontal. Sin embargo la transición y progresión de la enfermedad periodontal depende de factores ambientales y del paciente ¹⁻².

La regeneración de tejidos periodontales son una serie de procesos dinámicos, que involucran interacciones entre la matriz extracelular-célula y célula-célula. Una amplia gama de proteínas se ven coordinadas para que a partir de estas interacciones promuevan la regeneración, reparación y cicatrización de tejidos ³.

En la actualidad, la regeneración de tejidos mineralizados representa uno de los mayores problemas en la medicina regenerativa, por lo que existe un gran enfoque en la aplicación de nuevas terapias farmacológicas, como son el uso de proteínas recombinantes, aunque las técnicas de purificación de estas son costosas y requieren de complicados pasos para su uso. Los avances en la tecnología recombinante han permitido simplificar la producción de estas proteínas con la identificación de múltiples péptidos osteogénicos, con la capacidad de emular las características de una proteína recombinante o nativa ⁴. Se ha demostrado que algunas proteínas de tejidos mineralizados pueden regular el proceso de regeneración ósea ⁵.

El proceso de regeneración de tejidos periodontales es iniciado en el momento que se produce un daño sobre algún tejido, con la producción de factores de crecimiento y citoquinas producidas por la respuesta inflamatoria ⁶. Se han intentado realizar numerosas estrategias terapéuticas para promover el incremento en la migración y unión de células

mesenquimales a la superficie radicular, la colocación de terapias guiadas como membranas reabsorbibles ⁷⁻⁹, injertos y sustitutos óseos ¹⁰ como la hidroxiapatita entre algunos otros y que han logrado desarrollar y guiar el control sobre la regeneración del tejido periodontal, sin embargo estas estrategias han tenido la problemática de no ser predecibles, además de no restaurar en su totalidad la arquitectura de los sitios periodontales dañados. Las recientes terapias e investigación se han centrado en el entendimiento de los diversos procesos celulares y moleculares que ocurren en el periodonto ¹¹⁻²². Dentro de estas estrategias, están el uso de factores de crecimiento; como el factor de crecimiento plaquetario, el factor de crecimiento insulínico ²³⁻²⁹, el factor de crecimiento transformante beta1 ³⁰, el factor de crecimiento fibroblástico ³¹, dexametasona ³² y proteínas morfogenéticas óseas ³³⁻³⁸. Estas investigaciones han contribuido a hipotetizar que estas moléculas son producidas durante la formación del periodonto y almacenadas en la matriz del cemento, para inducir la regeneración del ligamento periodontal cuando sea necesario. Sin embargo uno de los problemas para la aplicación de estas terapias moleculares es la actividad no específica de algunos factores sobre diferentes linajes celulares y la rápida pérdida de funcionalidad de estos factores una vez aplicada la terapia ^{26,39}.

REGENERACIÓN ÓSEA

El proceso de regeneración ósea se refiere a la reproducción o reconstitución de una zona perdida o lesionada, atribuidos a accidentes, extirpación quirúrgica de lesiones benignas o neoplasias malignas, anomalías congénitas, inflamación periodontal, abscesos o extracción de órganos dentales; provocando atrofia debido a la edad avanzada o enfermedad general que puedan presentar los pacientes. Estos defectos óseos requieren ser tratados para mantener el perfil anatómico normal y regresar una armonía estética y funcional. Hoy en día, se han desarrollado varias técnicas para eliminar estos defectos óseos, como son: los injertos óseos, la regeneración ósea guiada, la osteogénesis por distracción, el uso de factores de crecimiento y uso de células madre ^{1,2}.

Los injertos óseos consisten en materiales de origen natural o sintético, los cuales serán implantados en el sitio del defecto. Actualmente, se dispone de una variedad de materiales

de restauración ósea con diferentes características, que poseen diferentes propiedades. A pesar de años de esfuerzo, el material de reconstrucción ósea "ideal" aún ha sido desarrollado. Por ello en la actualidad se han intentado, numerosos esfuerzos para que la terapia periodontal incluya no solo la detención de la progresión de la enfermedad periodontal, sino también la regeneración de estructuras perdidas por la enfermedad cuando sea apropiado. Han sido identificados nuevos materiales como posibles moduladores biológicos para mejorar la cicatrización de heridas y la regeneración de los tejidos óseo, como es el uso de proteínas, péptidos y factores de crecimiento, los cuales dirigirán los procesos de osteoconducción y osteoinducción ⁴⁰.

CEMENTO RADICULAR

Uno de los tejidos periodontales que ha cobrado importancia en la actualidad para su estudio es el cemento radicular; el cual se puede describir como un tejido mineralizado que cubre la superficie radicular de dientes y funciona para anclar los dientes al hueso alveolar a través de fibras colágenas del ligamento periodontal. La matriz del cemento presenta diferencias morfológicas, histológicas y funcionales a lo largo de la raíz, lo cual permite clasificarlo en:

Cemento acelular (coronal y a la mitad de la raíz).

Cemento celular (en la parte apical y en la porción inter-radicular de la raíz la cual presenta cementoblastos). ^(22, 41-48).

El cemento radicular funciona como excelente depósito de factores de crecimiento, los cuales podrán ser liberados ante diversos eventos como es el proceso de desmineralización y podrían funcionar como reparadores de tejido. El cemento es un tejido similar al hueso alveolar y a la dentina, 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 de procesos de remodelación ya que presenta un proceso de aposición constante ⁴⁹.

Algunas proteínas encontradas en el cemento cumplen la función de ser nucleadoras de

cristales de fosfato de calcio, en donde un número de moléculas se van agregando o depositando hasta formar diversos núcleos con capacidad de desarrollar un crecimiento mineral ⁵⁰.

COMPOSICIÓN MINERAL

El cemento presenta un grado de mineralización menor que la dentina, sin embargo, química y fisiológicamente se sabe que presenta el mismo componente mineral aunque en menor grado comparado con otros tejidos calcificados siendo la Hidroxiapatita (HAp) el componente principal y una pequeña cantidad de fosfato de calcio amorfo ⁵¹. Debido a su bajo grado de cristalinidad, el cemento tiene una alta capacidad de absorción de fluoruro y es más rápido de descalcificar en presencia de condiciones ácidas ⁴³.

En el cemento se encuentran presentes otros iones minerales en distintas concentraciones entre ellos: 0.5-0.9% Mg, 0.9% de F, 0.1-0.3% de S y algunos otros elementos traza en una menor concentración como Cu, Zn y Na ^{52,53}.

COMPOSICIÓN ORGÁNICA

La matriz del cemento está constituida en mayor porcentaje por colágena tipo I en un 90 % y presenta un importante papel estructural en el proceso de biomineralización, funcionando como reservorio para la nucleación de cristales de HAp ⁵⁴, así como colágena tipo III, la cual cubre las fibras de colágena tipo I, mucopolisacáridos carboxilados y sulfatados (glicosaminoglicanos) presentes en el cemento humano ⁵⁵. Los glicosaminoglicanos son un grupo heterogéneo de glicoproteínas constituidas por largas cadenas de disacáridos. El gran contenido de glicosaminoglicanos está relacionado en función al elevado módulo de compresión que presenta el cemento radicular.

El ácido hialurónico, dermatan sulfato y condroitín sulfato son los glicosaminoglicanos en mayor porcentaje en el cemento humano en comparación con otros tejidos, sin embargo en el ligamento periodontal y el tejido conectivo gingival; el dermatan sulfato está presente en mayor cantidad ^{56,57}.

PROTEÍNAS NO COLÁGENAS

Las proteínas no colágenas del cemento radicular en su mayoría están presentes en el hueso y han sido clasificadas en:

Glicoproteínas:-Vitronectina (VN), Fibronectina, Laminina y Tenasina.

Fosfoproteínas: Osteopontina (OPN), Osteonectina (SPARC) y Sialoproteína ósea (BSP).

Ácido carboxiglutámicas: Osteocalcina (OCN), Albúmina, Inmunoglobulina G (IgG) ^{58,59}.

FIBRONECTINA

Es una proteína de la matriz extracelular. Se encuentra en forma de fibronectina plasmática y fibronectina celular. Es sintetizada principalmente por hepatocitos y la fibronectina celular es producida por células epiteliales, fibroblastos y células de tejido mesenquimal,. La principal función es en la cicatrización de heridas, los fragmentos proteolíticos funcionan como quimiotácticos para monocitos. Se cree que la fibronectina se une a células de la matriz extracelular y junto a la Tenasina se presentan durante la diferenciación de odontoblastos en la vaina epitelial de Hertwig y eventualmente al sitio de unión del ligamento periodontal a la superficie radicular ⁶⁰⁻⁶⁴.

SIALOPROTEÍNA ÓSEA

Es una fosfoproteína glicosilada y ácida, la cual constituye cerca del 15 % del total de proteínas no colágenas del hueso, es producida por osteoblastos, odontoblastos y cementoblastos. Su peso molecular teórico es de 33.6 kDa; sin embargo presenta un gran número de modificaciones postraduccionales, las cuales son principalmente glicosilaciones y diversos sitios de fosforilación por lo que presenta una movilidad relativa de hasta 80 kDa. Se piensa que el contenido de ácido glutámico es el posible responsable de su alta afinidad así como de la nucleación de cristales de HAp ⁶³⁻⁶⁶. Altos niveles de esta proteína son observados en células preosteoblasticas durante el principio de formación ósea y en osteoblastos maduros en sitios de remodelación ósea. Posee una secuencia RGD (Arg-

Gly-Asp) involucrada en la adhesión celular por medio de integrinas. Ha sido inmunolocalizada en hueso, dentina y cemento radicular; está asociada también en algunos carcinomas que hacen metástasis hacia el tejido óseo como mama, próstata, pulmón y tiroides. Tiene un importante papel en los sitios de mineralización por anclaje de osteoblastos, es expresada durante la cementogenesis y etapas iniciales en la formación de dentina y hueso alveolar, demostrando ser una molécula promotora de la formación mineral sobre la superficie radicular así como en la adhesión celular por sus motivos RGD y su interacción con las integrinas ^{62, 66-68}.

OSTEOPONTINA

Es una fosfoproteína glicosilada, presenta un gran contenido de serina, asparagina y glutamato ⁴⁷. Es encontrada en un alto nivel en riñón y células musculares lisas. Grandes niveles de osteopontina son observados en células preosteoblasticas en etapas iniciales de formación ósea y en osteoblastos maduros sobre zonas de remodelación ⁶³ En los tejidos mineralizados ha demostrado tener tres funciones principales:

1. Regulación de la adhesión celular al poseer dominios RGD los cuales interactúan con integrinas $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 1 y $\alpha\beta$ 5 ^{69, 70}.
2. Regulación en la actividad osteoblástica, ya que se asocia con la inhibición del crecimiento de cristales de HAp, integrinas y factores de crecimiento ⁶⁷.
3. Regulación de la mineralización de la matriz extracelular ⁶⁹.

En algunas células es expresada la OPN durante la cementogenesis. También regula la migración y diferenciación celular, participando en el proceso inflamatorio regulado por la activación de monocitos-macrófagos ⁷¹. Se relaciona con la expresión del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β), Factor de Crecimiento tipo Insulínico (IGF-I y II), Proteínas Morfogénicas de Hueso (BMP's), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y Factor de Crecimiento y Diferenciación 5 (GDF-5) ⁷².

OSTEOCALCINA

Se le denomina proteína Gla ósea y es conocida como proteína ácida de hueso γ -carboxiglutámico o BGP. Su peso molecular teórico es de 10.9 kDa y está constituida por 100 aminoácidos. Es sintetizada por osteoblastos, odontoblastos y es secretada dentro de la matriz ósea en el proceso de mineralización. Presenta una gran afinidad al calcio e interacción con la superficie de la HAp por medio de sus residuos Gla. Su distribución es limitada a mamíferos y tejidos mineralizados como hueso, dentina y cemento; siendo específicamente en este último en las zonas de cemento acelular y como recubrimiento en el cemento celular ^{67, 73, 74}.

Ha sido utilizada como un marcador sérico en la formación ósea osteoblástica y con un importante papel hormonal ^{75,76}.

FOSFATASA ALCALINA

Es una proteína glicosilada que presenta actividad enzimática localizada en la porción de la membrana citoplasmática y en las vesículas de la matriz ⁷⁷. Existen dos tipos de isoenzimas: Fosfatasa alcalina de tejido específico la cual participa en células germinales, placenta e intestino y la fosfatasa alcalina no específica (TNAP) con presencia en hígado, hueso (células endosteales, medula ósea, osteoblastos, cementoblastos y placas de crecimiento de cartílago) y riñón. La TNAP es un marcador temprano de la biomineralización ya que promueve la formación ósea y regula las concentraciones extracelulares de fosfatos debido a que cataliza la hidrólisis del pirofosfato inorgánico (PPi) al disminuir las concentraciones de este inhibidor de la mineralización además de incrementar los niveles de fosfato inorgánico (Pi) ^{78, 79}. La Fosfatasa alcalina específica de hueso ha demostrado ser un buen marcador para el metabolismo óseo ya que proporciona información sobre el recambio óseo en pacientes con enfermedades metabólicas como la osteoporosis ⁸⁰. Ha demostrado tener actividad en el ligamento periodontal con distribución homogénea en sitios adyacentes al hueso y cemento radicular (zona de cementogenesis)

⁸¹.

PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1)

La proteína del cemento 1 fue aislada por primera vez a partir de un cementoblastoma humano, es una proteína que cuenta con una masa molecular de 25.9 kDa, tiene un punto isoeléctrico (pI) de 9.73 y está constituida por 247 aminoácidos (Fig. 1) ; la proporción de estos es la siguiente: prolina (11.3 %), glicina (10.5 %), alanina (10.1 %), serina (8.9 %), leucina (8.1 %), treonina y arginina (ambas con 7.7 %), contiene una menor cantidad de triptófano, ácido aspártico e isoleucina (2 %) y fenilalanina (1.6 %) sin evidencia de péptido señal. El gen de CEMP1 se localiza en el cromosoma 16 en la región p13.3 y está conformado por 1374 nucleótidos. Un estudio por medio de micro arreglos de expresión evaluó el efecto biológico que una cantidad importante de genes asociados con el desarrollo, proliferación, crecimiento 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 hasta la fecha esta proteína no ha mostrado tener homología con ninguna otra *in silico* ^{3,58,59,82}.

```

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

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de la Proteína del Cemento 1.

<https://www.uniprot.org/uniprot/Q6PRD7>

Un estudio *in vitro* utilizando inmunocitoquímica confirma la expresión de CEMP1 en células derivadas de un cementoblastoma en un 95 % y la población y células del ligamento periodontal en un 6 % ⁸³. La proteína CEMP1 fue expresada también en células

osteoblásticas *in vitro* en un 3 % mientras que en fibroblastos gingivales no fue detectada. Estas pequeñas poblaciones de células del ligamento periodontal y osteoblastos podrían representar precursores de cementoblastos ⁸⁴.

La sobre expresión de CEMP1 provoca el incremento en la expresión de la Proteína de Adhesión del Cemento (HACD1/CAP) en células del ligamento periodontal, los mecanismos por los cuales se lleva a cabo esta regulación aún se desconoce; sin embargo la expresión de CEMP1, disminuye cuando las células se comprometen a un linaje osteoblástico/cementoblástico, sugiriendo que su expresión podría ser regulada de forma diferente en osteoblastos y cementoblastos, además que si se suprime la expresión de CEMP1 en células del ligamento periodontal se afecta la expresión de sialoproteína ósea en cementoblastos ³.

Se ha demostrado que tiene un importante papel como regulador en la diferenciación y mineralización en la matriz del cemento. Su expresión se restringe a cementoblastos y subpoblaciones de células progenitoras presentes en el ligamento periodontal, regulando la actividad cementoblástica e induciendo la diferenciación de células no osteogénicas (fibroblastos gingivales humanos) a un fenotipo cementoblástico/osteoblástico mediante la expresión de proteínas óseas y de la matriz del cemento además de aumentar la actividad de fosfatasa alcalina y proliferación con la expresión de genes como sialoproteína ósea, osteocalcina, osteopontina, el factor de transcripción Runx2/Cbfa1 y de la Proteína de Adhesión del Cemento (HACD1/CAP) ⁸⁴⁻⁸⁶.

Al ser expresada de forma recombinante en *Pichia pastoris* (hrCEMP1) presenta un aumento en su masa molecular del 2.4 %, debido a la presencia de glicosilaciones (probablemente dos N-acetilglucosaminas y dos residuos de manosa, los cuales se hipotetiza que están presentes en las asparaginas de la posición 20 y 25), es una proteína termoestable ya que la proteína permanece plegada a 73 °C, cuenta con una masa molecular de 28,700 Da. Por medio de dicroísmo circular se observó la presencia de estructura secundaria, revelando un contenido de alfa-hélice de 28.6 %, un 9.9 % de láminas beta y 61.5 % de estructura al azar, fue demostrado por primera vez que CEMP1 tiene actividad como lectina (tipo C), reconociendo específicamente al carbohidrato manopiranosido. En este estudio se demostró que hrCEMP1 promueve la nucleación de cristales de HAp *in vitro* en un tiempo de 14 días en un sistema libre de células, mediante la

deposición de cristales organizados en matrices paralelas, a través de la interacción proteína-proteína y proteína cristal mediante un proceso de auto ensamblaje. Se observan esférulas con un tamaño de $130 \pm 20 \mu\text{m}$, estas estructuras se disponen de forma de varillas delgadas compuestas principalmente por calcio y fósforo. Por medio de la técnica de Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS) se determinó la relación Ca/P, de 1.58, que es similar al de la HAp. ⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾.

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 9 mm en las calvarias de ratas se analizaron las muestras a través de cortes histológicos e imágenes por micro tomografía observando que después de 16 semanas CEMP1 es capaz de regenerar el 97% del defecto óseo ⁹⁰.

Los resultados de estos estudios indican que la molécula de CEMP1 posee propiedades biológicas y farmacológicas, por lo que se piensa que tiene un papel importante en el proceso de mineralización, así como en la regeneración de tejidos mineralizados ^{88,90}.

PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO

Es una proteína constituida por 140 aminoácidos (Fig. 2) con un pI de 6.37, su gen se localiza en el cromosoma 10p13-p14, se considera un splicing alternativo (isoforma 2) del gen HACD1. El análisis de alineamiento y búsqueda de homología de secuencia (BLAST) reveló que el N-terminal de 125 aminoácidos es idéntica a la 3-hidroxiacil-CoA deshidratasa 1 siendo los últimos 15 aminoácidos la diferencia entre ambas isoformas. **Artículo gonzalo**
Se ha identificado como una proteína que participa en el reclutamiento y diferenciación celular durante la formación del cemento. Es expresada en células del folículo dental, promoviendo su adhesión y diferenciación además de ser localizada en cementoblastos, cementocitos y células paravasculares del hueso alveolar. Es una proteína hidrofóbica y su localización se predice como citoplasmática en un 94.19 % debido a la carencia de un péptido señal. Se cree que las vías de señalización intracelular involucradas son Smad-1 (vía canónica de señalización de BMP) y vía MAPK participando en la proliferación y diferenciación celular.

Utilizando una concentración de 20 µg la proteína recombinante hrHACD1/CAP se demostró que esta asociada en la formación y composición de cristales de HAp en un sistema libre de células *in vitro*, mostrando capacidad de regular la morfología y fase cristalina. Mediante un ensayo por composición constante se determinó que a concentraciones inferiores de 7.5 µg actuaba como un posible inhibidor; sin embargo a concentraciones superiores promueve la formación de HAp. Para evaluar su efecto terapéutico se realizaron experimentos sobre calvarias de ratas Wistar a las cuales les fue realizado un defecto de tamaño crítico y se demostró su potencial como regenerador óseo craneofacial. Se piensa que esto se debe a la inducción de la neovascularización y un posterior reclutamiento de células troncales mesenquimales al ser expresada por células troncales paravasculares en el ligamento periodontal, las cuales son progenitoras de osteoblastos y cementoblastos.

Recientemente se ha diseñado un péptido sintético derivado de HACD1/CAP, el cuál está constituido por los últimos 15 aminoácidos, ubicados en el extremo carboxilo (VSFPSCCFSIIVIFM), con un peso molecular de 1.65 kDa y un punto isoeléctrico de 5.48. En un sistema de contradifusión en gel de metasilicato libre de células se demostró que una concentración de 20 µg del péptido promueve la formación de cristales de HAp, con un crecimiento prismático muy ordenado y que emergen de un núcleo formando esférulas de 200 µm después de 24 hrs^{91,92}. En este estudio se evaluó en un gestor de titulación programado para mantener un pH de 7.4 por 240 min después del inicio de la reacción de crecimiento de cristales. La reacción se inició mediante la adición de 450 µl de una suspensión de HAp, la tasa de crecimiento se expresó como un porcentaje de crecimiento en comparación con la observada en ausencia del péptido. Los resultados muestran que a una concentración de 20 µg/mL, el péptido podría promover el crecimiento de cristales^{92, 93}.

En estudios *in vivo* se ha utilizado el péptido como terapia para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo murino. Se demostró que el péptido puede detener el proceso osteoporótico además de demostrar mejorar las características y función natural del hueso, como un aumento en la masa ósea, restitución trabecular, aumento de la cantidad de soporte y resistencia a fuerzas mecánicas. La concentración utilizada fue de 40 µg/día

promoviendo la regeneración ósea y recuperando las características que emulaban al grupo control sano ⁹⁴.

■

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

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la Proteína HACD1/CAP

<https://www.uniprot.org/uniprot/B0YJ81>

FACTORES DE CRECIMIENTO DERIVADOS DEL CEMENTO

Los factores de crecimiento son un grupo de proteínas naturales, los cuales presentan una variedad de propiedades locales potentes. Estas moléculas son la llave principal para la regulación de diversos eventos biológicos con la migración, unión y proliferación entre células. Algunas de las características que presentan estos factores de crecimiento es que son producidas por células de forma natural y se relacionan con diversos mecanismos celulares como la división celular, crecimiento, migración y diferenciación en diversos procesos como la cicatrización, regeneración de tejidos y producción de proteínas en la matriz extracelular ⁹⁵.

Presentan actividad como receptores, ya que al no poder difundir a través de la membrana celular, su actividad es regulada cuando se unen primero a los receptores de membrana celular de alta afinidad, generando una respuesta dependiente al tipo de factor presente en los receptores celulares. Numerosos factores de crecimiento han sido identificados y caracterizados, por lo que su expresión posterior a una lesión en algún tejido mineralizado o blando, podría dirigir la reparación, aceleración y regeneración de los tejidos dañados ⁹⁶⁻¹⁰⁰.

El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) es un factor que presenta un

efecto inicial de estimulación en el proceso de resorción ósea, sin embargo en recientes estudios se ha demostrado que también juega un papel importante en la formación de hueso nuevo; participa en la actividad mitogénica y en la quimiotaxis de osteoblastos. Siendo competitivo al Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) ha demostrado potenciar la cicatrización de heridas y la regeneración del ligamento periodontal, hay siete miembros identificados con una actividad similar; mitogénico para las células del mesodermo y neuroectodermicas y como potente angiogénico. El Factor de Crecimiento Insulínico está constituido por una familia de proteínas simples, dos miembros de esta familia IGF-1 y IGF-2 presentan una estructura similar y función pero se regulan de forma independiente. IGF-1 es un factor importante que es requerido en el ciclo celular, tiene la capacidad de inhibir el proceso de apoptosis celular. Algunas investigaciones utilizando diversas concentraciones molares en cultivos primarios han demostrado la expresión de algunos genes específicos como el de la Amelogenina y Ameloblastina, por lo que se piensa que el IGF-1 está involucrado en el proceso de biomineralización de esmalte, tiene un papel estimulante en la reparación pulpar y dentinogénesis. Al estar presente en las plaquetas, participa durante la coagulación siendo un potente quimiotáctico para células endoteliales vasculares. Al ser liberado por fibroblastos puede promover la migración de células vasculares endoteliales hacia el área dañada, promoviendo la neovascularización y estimulando la mitosis de células como osteoblastos y condrocitos. En la actualidad han sido establecidos diversos factores de crecimiento de importancia en diversos tejidos mineralizados, los cuales son excelentes reservorios de estos factores que serán ocupados cuando se necesiten en diversas circunstancias, como eventos de desmineralización, en la reparación o regeneración de tejidos, promover la migración celular, adhesión, actividad y diferenciación mitogénica. El Factor de Crecimiento Transformante (TGFs) es una familia de proteínas estructural y funcionalmente no relacionadas, en la actualidad los más estudiados son TGF- α y TGF- β . El TGF- β presenta tres formas TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 , presenta una actividad bifuncional como modulador multifuncional de proliferación celular el cual puede inhibir la proliferación en diferentes tipos celulares. El Factor de Crecimiento Fibroblástico, tiene afinidad a la heparina, sin embargo este factor no presenta afinidad hacia el hueso alveolar⁹⁹⁻¹⁰⁷.

El Factor de Crecimiento Derivado del Cemento actúa de forma sinérgica con el Factor de

Crecimiento Epidermal e induce un aumento en las tasas de vías de señalización asociadas a la actividad mitogénica. En estas vías incluye un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, activación de la proteína C y expresión de pro-oncogenes celulares. Por otro lado el factor de crecimiento derivado del cemento puede promover la migración y crecimiento de células progenitoras, presentes en las estructuras adyacentes hacia la matriz dentinaria y participan en la diferenciación a cementoblastos. Una de las características particulares del Factor de Crecimiento Derivado del Cemento es que la actividad mitogénica estaba asociada con una proteína de 14 kDa que mostraba cierta homología con el Factor de Crecimiento Insulínico 1. La presencia de este factor de crecimiento tiene el potencial de regular el metabolismo y el recambio en los tejidos circundantes al cemento, los cuales podrían servir como un sitio de almacenamiento para estas moléculas y proteínas del cemento para inducir el crecimiento de tejidos y regular la actividad biológica en la regeneración periodontal³.

UTILIDAD DE PÉPTIDOS EN LA REGENERACIÓN PERIODONTAL

En la actualidad la regeneración ósea ha tenido gran importancia en la medicina regenerativa, utilizando un gran número de proteínas y péptidos que han sido desarrollados e investigados como candidatos potenciales para regulación del proceso de biomineralización. Recientemente algunos experimentos *in vitro* y en modelos animales han demostrado que algunas proteínas derivadas de tejidos mineralizados pueden regular el proceso de cicatrización y reparación ósea¹⁰⁸.

Aún no está definido el uso y acoplamiento entre proteínas de la matriz extracelular o recombinantes como método terapéutico, ya que presenta limitaciones técnicas en su purificación, resultando ser altamente costosas, además de requerir altas dosis para un posible tratamiento, resultando ser un gran inconveniente para su uso en la actualidad⁸⁸.

Hoy en día se han centrado investigaciones en la identificación de dominios conservados como el dominio funcional RGD (arginina, glicina y ácido aspártico) en diversas proteínas de la matriz extracelular como la colágena, vitronectina, OPN, Factor Willebrand, tenscina, BSP, fibrinógeno y laminina¹⁰⁹⁻¹¹¹.

La utilidad de péptidos ha funcionado como una alternativa para diversas áreas, dentro de ellas la odontología, utilizando polipéptidos sintéticos derivados de DMP1 con la capacidad de unirse a zonas desmineralizadas en la dentina humana, estos péptidos tienen potencial de estabilizar la nucleación a partir de niveles fisiológicos de calcio y fosfato, promoviendo la formación de HAp dentro de una matriz de colágena en un breve tiempo de exposición¹¹².

La Amelogenina tiene un papel importante en el proceso de mineralización de HAp, en comparación con otras proteínas del esmalte como: Enamelinas, Estatetlinas, Ameloblastina, Amelina, Anamelina y Matriz Metaloproteinasa-20. La forma de auto ensamblaje es por medio de clusters haciendo una pre nucleación mineral, formando nano partículas compuestas, las cuales se ensamblan en cadenas lineales y paralelas, formando el conjunto de cristales alargados evidente en el esmalte¹¹³⁻¹¹⁵. Se han identificado algunos péptidos funcionales derivados de la Amelogenina los que pueden interactuar en sistemas libres de células como agentes remineralizantes, además de contribuir en la regeneración del tejido periodontal³.

Estudios recientes mostraron el efecto de un péptido de CEMP1 (CEMP1-p1) como inductor del proceso de mineralización distinto a los ya reportados; este péptido tiene la capacidad de promover 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 CEMP1-p1 en comparación con CEMP1¹¹¹.

Los resultados de este estudio demostraron que los péptidos derivados de CEMP1 (CEMP1-p1 y CEMP1-p3) 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^{90,116}.

CEMP1-p1 mostró la capacidad de inducir la diferenciación de células del ligamento periodontal humano hacia un fenotipo mineralizante *in vitro*. Los resultados *in vivo* indicaron un potencial osteoinductivo ya que promueve la formación y maduración de hueso nuevo. Por ello se propuso como una nueva molécula con propiedades similares a la proteína recombinante, con numerosas ventajas, como mayor disponibilidad, bajo costo y resistencia

a la degradación por proteasas⁸⁸.

PÉPTIDO DE LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1-p3)

Se ha demostrado que el proceso de biomineralización es el resultado de la organización e interacción entre proteína-proteína, proteína-mineral, proteína-célula o bien, la interacción entre grupos o dominios funcionales activos los cuales interaccionan entre sí para desencadenar una serie de eventos o parámetros químicos y biológicos en un organismo. Sin embargo aún se desconoce la importancia que presentan diversos parámetros químicos como: el pH, temperatura, concentración, tiempo durante el acoplamiento, organización molecular y eventual formación de estructuras; que permitirán su análisis por medio de estrategias computacionales y biofísicas.. Se cree que las secuencias que presentan una estructura desorganizada o aleatoria pueden regular y coordinar específicamente interacciones de algunas proteínas y algunos procesos fisiológicos como es la formación de hueso y dentina. Estas interacciones promueven la formación del tipo y tamaño de un cristal que eventualmente madurará hasta la formación de un tejido mineralizado. Por otro lado, se piensa que cuando las moléculas presentan algún tipo de estructura secundaria (α -Hélice y β -plegadas), estas quedan expuestas en distintas zonas del cristal de forma superficial logrando interaccionar mediante motivos o regiones específicas de aminoácidos, logrando que algunas cadenas laterales aminoacídicas puedan ser responsables de ciertas características de estas proteínas y las hagan interaccionar con los medios presentes en su entorno¹¹²⁻¹²⁵.

Por ello es indispensable la identificación de motivos específicos dentro de la secuencia de CEMP1 que cumplan con ciertos parámetros físico químicos que hagan predecir que la secuencia peptídica de interés, tenga un posible papel en la formación y maduración de cristales de fosfato de calcio y eventualmente aplicarlo *in vivo* sobre un modelo animal.

El modelado *in silico* de CEMP1 ha demostrado la presencia de múltiples regiones desorganizadas (1-24, 36-56, 205-220, 252-264) y principalmente una región de 43 aminoácidos en la parte central de la proteína (141-184), este dato es importante ya que se ha demostrado que estas moléculas tiene el potencial de promover la participación en eventos químicos, celulares, señalización celular, auto ensamblaje molecular, crecimiento y

nucleación.. La caracterización de proteínas no colágenas asociadas a la formación de cristales de fosfato de calcio permitió identificar regiones similares las ya descritas en proteínas ácidas como regiones ricas en ácido aspártico, ácido glutámico y serina, las cuales reconocen y dirigen el crecimiento del cristal, es una proteína glicosilada, tiene alta afinidad a la HAp ¹²⁶.

Al analizar la secuencia de aminoácidos de CEMP1, se identificaron regiones con aminoácidos ácidos y ricas en serina: SSTDS (residuos 4-8), STSNTSAE (residuos 17-24), EENS (residuos 147-150) y SCSGS (residuos 217-221) algunas secuencias peptídicas expuestas sobre la superficie de la proteína, presentan secuencias repetitivas de aminoácidos los cuales tienen un importante papel en diversos procesos de biomineralización, por lo que estos dominios podrían presentar excelentes propiedades biológicas ⁸⁷.

Este péptido está constituido por 20 aminoácidos (**QPLPKGCAAVKAEVGIPAPH**), presenta un pI de 8.1 y una masa de 2111.08 Da, se predice una estructura secundaria constituida por una α -Hélice y dos regiones aleatorias a los extremos, el grupo imidazol de la histidina puede actuar como donador de electrones hacia la superficie de la hidroxiapatita ante un pH fisiológico, así mismo grupos carbonilo presentes en la glutamina, glicina, prolina y lisina así como grupos metilo en la isoleucina, alanina, y valina proporcionando un carácter hidrofílico al péptido.

Para definir si el péptido CEMP1-p3 mostraba secuencias aminoacídicas relevantes la formación de cristales de fosfato de calcio, se utilizó el programa I-TASSER (iterative threading Assembly Refinement) y un programa predictor de regiones desordenadas naturales (PONDR VL-XT; <http://www.pondr.com/pondrtut2.html>) confirmando que existían regiones peptídicas intrínsecamente desordenadas ^{127,128}.

Al ser un péptido que muestra características estructurales importantes y una secuencia aminoacídica única que lo pueden hacer interaccionar mediante sus cadenas laterales, formación de clusters o interacción por medio de cargas iónicas con la superficie y la

formación de un cristal como es la hidroxiapatita o fases minerales previas como el Fosfato Octacálcico, sugerimos que este péptido podría presentar propiedades físico-químicas que emulen o mejoren las características ya reportadas de CEMP1 y que podrían resultar de interés en el área de regeneración y bioingeniería de tejidos como una biomolécula con potencial para su estudio y en el tratamiento de defectos óseos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad el uso de péptidos ha cobrado importancia en el área de biomineralización y bioingeniería de tejidos, con el desarrollo de biomoléculas capaces de mimetizar a una proteína recombinante o nativa, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual estas biomoléculas promueven el proceso de biomineralización, la forma en que interactúan con la superficie de la HAp, los arreglos moleculares que sufren y la posible nucleación de cristales de fosfato de calcio que eventualmente maduraran hasta formar la hidroxiapatita.

JUSTIFICACIÓN

Se han reportado estudios sobre secuencias peptídicas de CEMP1, las cuales, han demostrado tener un papel importante en el proceso de mineralización en un sistema *in vitro*, promoviendo el crecimiento de cristales de fosfato Octacálcico, siendo esta una fase mineral previa a la formación de HAp. Se realizaron análisis en otra secuencia de CEMP1 (CEMP1-p3), la cual presenta un punto isoeléctrico (pI) 8.21, constituida por aminoácidos de relevancia en el proceso de biomineralización y que podrían promover la nucleación de cristales de HAp como es la alanina, glicina, prolina lisina y valina, al ser una secuencia de 20 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 1.983 kDa y de naturaleza hidrofílica nos permitiría reducir una posible reacción inmunológica además de realizar la caracterización físico-química del péptido, permitiendo emular la acción de la proteína recombinante CEMP-1 y lograr comprender como se lleva a cabo el proceso de auto ensamblaje y direccionalidad sobre uno o varios ejes de crecimiento del cristal de la hidroxiapatita, lo que permitiría en un futuro el desarrollo de biomateriales con una coordinada interacción ósea, logrando aumentar la biocompatibilidad, bioactividad y osteoconductividad.

HIPÓTESIS

El péptido CEMP1-p3 regula la nucleación de cristales de Hidroxiapatita *in vitro* y promueve la regeneración ósea *in vivo*.

OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización físico/química del péptido CEMP1-p3 durante el proceso de biomineralización *in vitro*, así como su potencial terapéutico en la regeneración ósea.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar el potencial y la concentración mínima del péptido CEMP1-p3 en la formación de cristales de HAp en un sistema de contradifusión libre de células.
- Caracterizar mediante diversas técnicas microscópicas y espectroscópicas la topografía, grupos funcionales y composición química de los cristales de fosfato de calcio del péptido CEMP1-p3.
- Identificar la afinidad del péptido CEMP1-p3 hacia algún plano de crecimiento cristalino de la HAp.
- Evaluar características y parámetros químicos del péptido CEMP1-p3
- Determinar el crecimiento de HAp utilizando distintas concentraciones del péptido CEMP1-p3 en un sistema de crecimiento constante.
- Determinar *in vitro* la actividad biológica de CEMP1-p3 durante los procesos de proliferación y mineralización en Células del Ligamento Periodontal Humano (HuPLCs).
- Determinar el efecto terapéutico en la regeneración ósea del péptido CEMP1-p3 *in vivo*.

METODOLOGÍA

SÍNTESIS DEL PÉPTIDO CEMP1-p3

Está compuesto por una secuencia de 20 aminoácidos a partir del aminoácido 50-70 **QPLPKGCAAVKAEVGIPAPH**. Fue sintetizado por la técnica de fase sólida (FMOC). El péptido fue purificado por cromatografía líquida de fase reversa C-18 con un >95 % de pureza (New England Peptide, Ipswich, MA, USA) con una masa de 2111.08 Da. El péptido fue suspendido y disuelto en agua desionizada a temperatura ambiente. Todas las soluciones fueron filtradas con una membrana 0.22 µm antes de utilizarlo.

PREDICCIÓN DE UN MODELO TRIDIMENSIONAL *IN SÍLICO*

Los software USFC Chimera es servidores en línea de gran ayuda para predecir arreglos moleculares en 3D, el que permitirá la obtención de un modelo teórico *in silico* de CEMP1-p3 para evaluar las características e interacciones de los grupos funcionales en la secuencia aminoacídica, así como la formación de estructura y regiones desordenadas. Por otro lado ExPASy permitió determinar parámetros como el punto isoeléctrico e índice de hidrofobicidad.

ENSAYO DE CRECIMIENTO POR TITULACIÓN CONSTANTE

Utilizando un gestor de titulación conectado a un potenciómetro se mantuvieron parámetros constantes como pH 7.4 - 7.41, 37°C ± 1 por 240 minutos, se midió la tasa de crecimiento en una suspensión de HAp como control y una experimental utilizando CEMP1-p3. Este sistema funciona a través de un electrodo que controla dos buretas; la primera presenta una solución de Ca(NO₃)₂, NaCl y la segunda Na₂HPO₄ iniciando la reacción con la adición de 450 µl de una suspensión de HAp.

SISTEMA DE CONTRADIFUSIÓN *IN VITRO*

Este es un sistema para la obtención de cristales de fosfato de calcio. Está constituido por dos vidrios de 7 cm x 9 cm x 3 mm formando un casete, sellado con silicón de vacío y un marco de neopreno de 3 mm de grosor. El sistema está asegurado con adaptadores metálicos para evitar fugas. El gel de silicato donde se formarán los cristales está compuesto de 2 ml de metasilicato de sodio 1.06 gr/mL, 1.08 mL de HEPES buffer 10mM pH 7.2, 0.2 ml de HEPES buffer 10 mM más azida de sodio 1%, 1.08mL de H₃PO₄ 1M con pH y temperatura fisiológica.

La concentración del péptido fue de 20µg/ml con una concentración final de 100 µg. Dos grupos controles utilizando 20 µg de albúmina (BSA sigma St Louis MO) por cada mililitro de solución de gel de silicato y otro grupo control (sin péptido). La solución de difusión empleada fue cloruro de calcio a 150 mM preparado en HEPES buffer 10 mM y pH 7.4 y las muestras fueron incubadas a 37 °C por 7 días.

Utilizando los mismos parámetros del primer experimento, fue evaluado el comportamiento del péptido modificando el valor del pH a 6.8, 7.2 y 8.2.

Posterior al día 7, mediante MicroMounts (MiTeGen Ithaca, NY) de 150 µm los cristales fueron separados del gel y recolectados, utilizando un microscopio estereoscópico (Stemi SV11 Carl Zeiss). Los cristales fueron almacenados en tubos eppendorf de 1.5 ml.

DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ

Esta técnica es útil para determinar el comportamiento, tamaño y agregación de diversas moléculas mediante el estudio de su radio hidrodinámico a través de la formación de partículas únicas denominados monómeros y la interacción entre ellos para formar subunidades más grandes en forma de dímeros y oligómeros donde el fotón incidente induce un dipolo oscilante en la nube electrónica. Al cambiar el dipolo, la energía se irradia y dispersa en todas direcciones, donde la intensidad de luz dispersada es proporcional a la

masa molecular y concentración.

La muestra se midió a una longitud de onda de 632.8 nm, el ángulo de dispersión fue de 173°, realizando 10 mediciones por muestra y un índice de refracción de 1.330 a 25 °C. Se utilizó una concentración del péptido a 1 mg/ml en un amortiguador de HEPES 20 mM , pH 7.4 y un amortiguador de citrato de sodio 50 mM, pH 6.5; teniendo como variante la temperatura a 20 °, 32 ° y 37 °C; para observar el comportamiento que presenta el péptido en solución.

CARACTERIZACIÓN DE CRISTALES DE FOSFATO DE CALCIO POR DIVERSAS TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

Los cristales de fosfato de calcio se analizaron en el Instituto de Física de la UNAM mediante el Microscopio Electrónico de Barrido por Emisión Termiónica de bajo vacío (JSM-5600LV) y un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo; Schottky Field Emission Scanning Electron Microscopy FE-SEM (JSM-7800F), el cual permitió evaluar estructuras en un orden de 0.7 nm. Mediante la técnica de electrones secundarios y retrodispersados se obtuvieron microfotografías a distintas ampliaciones, utilizando porta muestras cilíndricos donde se colocaron las esférulas y fueron recubiertas por una película de carbón de 5 a 10 nm de espesor con una corriente de 35 amperes en un Sistema Vacuum gauge utilizando de 20 a 50 Militors. Las muestras se analizaron a un kilovoltaje (KV) de 10 – 15 KV y una distancia de trabajo (WD) de 6 – 8 mm. El análisis químico elemental se realizó por Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS) a 6 KV. Este es un análisis semicuantitativo y mediante el porcentaje atómico de los elementos Ca y P nos permitió determinar su relación y establecer una posible fase mineral comparada con tablas ya establecidas de distintos minerales.

La cristales se analizaron por Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM) JEM2010FEG. Las muestras fueron preparadas por dos pasos. Primero se pulverizaron los cristales mediante un mortero, posterior a esto se crearon subpartículas mediante una técnica de vacío a través de una jeringa de cristal por lo que la dispersión de las partículas de polvo obtenidas fueron depositadas sobre una rejilla de cobre de 300 mesh de la marca SPI recubiertas con una película de parlodian al 2 % y una capa fina de carbón

de 2 a 5 nm.

Para determinar la fase mineral por medio de la distancia interplanar se utilizó la Transformada Rápida de Fourier (FFT) y con ayuda del software Digital Micrograph y se midieron las distancias interplanares corroborando la fase cristalina con tablas internacionales de rayos X.

La presencia de grupos fosfato y grupos funcionales fueron analizados por Espectroscopia de μ RAMAN en el equipo DXR RAMAN, thermo scientific, con una longitud de onda de 532 nm, una apertura de 25 μ m y un tiempo de adquisición de 10 segundos por cada muestra.

Por medio de Microscopía de Fuerza Atómica en el Instituto de Investigaciones en Materiales UNAM fue posible determinar las características superficiales y topográficas de un cristal, permitiendo la obtención de imágenes tridimensionales utilizando el software WinSP process.

La técnica de Difracción de Rayos X a bajos ángulos por el método de polvos, es una herramienta útil en la caracterización de materiales cristalinos para determinar su fase mineral. Al analizar la muestra se obtiene un gráfico denominado difractograma, el cual presenta distintas intensidades registradas por un detector en función del ángulo 2θ registrando picos que corresponden a las reflexiones de los planos cristalinos que cumplen con la Ley de Bragg ($2d\text{Sen}\theta = n\lambda$) donde d representa la distancia entre planos cristalinos, θ es el ángulo de difracción y λ es la longitud de onda de los rayos X.

La posición relativa de las reflexiones es característica de una estructura cristalina en particular “huella digital”, identificando las diferentes fases cristalinas que conforman una muestra, lo cual significa que se pueden determinar las distancias entre planos cristalinos, los parámetros de red y grupos espaciales. Se utilizó un equipo Rigaku UIV, en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, cada muestra fue analizada en porta muestras porton zero background holder a 40Kv 30 mA, el ángulo 2θ fue variado de 5° a 80° .

Para complementar el análisis de los difractogramas se utilizó el software “Materials Data Jade” de “MDI Materials Data” logrando determinar las posibles fases cristalinas que presenten los cristales de fosfato de calcio.

CULTIVO CELULAR

Se aislaron y cultivaron células del ligamento periodontal humano (HuPLCs) ⁸⁶. Entre el segundo y quinto pasaje fueron utilizadas en los experimentos. Las células fueron cultivadas en medio DMEN con 10 % de suero fetal bovino (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en 5 % de CO₂ y 95 % de aire con 100 % de humedad.

EFEECTO DEL PÉPTIDO DE CEMP1 EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

La proliferación celular fue determinada por un ensayo de colorimetría 3-(4,5-dimetiltazol-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT), Las células HuPLCs fueron cultivadas en una densidad de 1×10^4 en una caja de 96 pozos (Thermo Fisher Scientific). El grupo de células experimentales fueron tratadas en un tiempo de 0, 24, 48, 72 y 96 hr a una concentración de 1, 3, 5 $\mu\text{g/ml}$ del péptido en 0.5 % de Suero Fetal Bovino (FSB) y el medio fue reemplazado todos los días. El cultivo control (sin péptido) se cultivó con 0.5 o 10 % de FSB como controles negativos y positivos respectivamente. Al término del tratamiento se añadió 10 μl de solución MTT (5 mg/ml; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) en un Amortiguador Fosfato Salino (PBS), se incluyeron a los pozos de cultivo e incubados a 37 °C por 4 horas. Posterior a la incubación con de MTT se colocó 100 μl de amortiguador de lisis (20 % de dodecil sulfato de sodio, 50 % de dimetil formamida pH 4.7) incubado por 1 hora a 37 °C. Los resultados de la solución se leyeron a 570 nm sobre un micro plato de lectura (Filter Max F5; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA

Las células HuPLCs fueron cultivadas a una densidad de 2×10^4 en 24 pozos de cultivo por 5 y 15 días en las condiciones ya descritas. La actividad de Fosfatasa Alcalina (ALP) se determinó con la técnica descrita por Lowry et al ¹²⁹. La actividad fue expresada en nanomoles p-nitrofenol por minuto por miligramo de proteína. El contenido de proteína se determinó con albumina de suero bovino como lo describe la técnica de Bradford. Los experimentos se hicieron por triplicados.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MINERALIZACIÓN.

Las células HuPLCs se cultivaron en una densidad de 5×10^4 con 10 % de FBS, 3 mM de β -glicerofosfato y 50 $\mu\text{g/ml}$ de ácido ascórbico (controles) o 5 $\mu\text{g/ml}$ del péptido CEMP1-p3 (experimental) por 5, 10 y 15 días. Las células se fijaron con 70 % de etanol y secadas con aire a diferentes tiempos. Los cultivos fueron evaluados por medio de la precipitación de calcio por la técnica de Rojo de Alizarina al 2 % (ARS; Millipore Sigma, Burlington, MA, USA) por 10 min. Para cuantificar la intensidad de los depósitos de calcio, se utilizó el método de cloruro de cetilpiridinio (CPC). Posterior a la tinción con ARS, CPC (10 % w/v, en agua destilada; Millipore Sigma) se añadió a cada disco (2 ml/por plato) e incubado por 1 hora a 37 °C. Después de incubar la solución transparente de CPC tomó un color púrpura, el cual se diluyó 5 veces (10 % w/v) y se transfirió a un plato de 96 pozos (100 μl / por pozo) realizando una lectura de absorbancia a 570 nm (Filter Max F5; Molecular Device). Los experimentos se repitieron dos veces.

RT-PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL qRT-PCR

Las HuPLCs fueron cultivadas por 5, 10 y 15 días. El total del ARN se extrajo de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante con trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El ARN fue cuantificado con un espectrómetro (Nanodrop; Thermo Fisher Scientific). Fueron utilizados diez nano gramos para la reacción y el nivel de expresión de ARN mensajero (ARNm) fue cuantificado por el método de qRT-PCR con un kit SuperScript III Platinum Sybr Green One-Step qPCR (Thermo Fisher Scientific). Se utilizaron 25 μl para iniciar la reacción de PCR: La síntesis del ADN complementario (ADNc) fue a 50 °C por 3 min y el proceso de desnaturalización inicio a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos y 40 segundos por 1 minuto. El proceso de amplificación se realizo en un Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Germantown, MD, USA).

Los primers codificaron para las secuencias de genes humanos de IBSP, OCN, BMP2, RUNX-2, OSX, CEMP1 y GAPDH.

ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

Las HuPLCs fueron cultivadas en una densidad de 5×10^4 en platos de cultivo de 6 pozos por 5, 10 y 15 días, tratadas sin y con $5 \mu\text{g/mL}$ del péptido. Al terminar el experimento las células fueron raspadas y disueltas en un amortiguador de lisis que contiene 1 % de SDS y un coctel de proteasas inhibitorias. Los Western Blot se realizaron con anticuerpos policlonales de conejo anti humano OSX, RUNX2, BMP2, OCN, GAPDH, CEMP1 y un anticuerpo anti humano IBPS (Santa Cruz Viotechnology, Dallas, TX, USA). Las proteínas de los grupos experimental y control ($20 \mu\text{g/carril}$) fueron separados por SDS 12 % PAGE, utilizando una cámara de electrotransferencia en una membrana PVDF (Inmmobilion-P; MilliporeSigma). Las membranas fueron bloqueadas con 5 % de leche sin grasa por 1 hr e incubadas con un primer anticuerpo 1:1000 por 1 hr. Posterior las membranas fueron lavadas, e incubadas con el segundo anticuerpo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano anti conejo 1:1000 o un anticuerpo secundario de cabra anti ratón IgG por 1 hr. Las membranas fueron lavadas con PBS tal y como lo describe Álvarez-Pérez *et al.*⁵⁸. Todas las membranas fueron escaneadas utilizando un escáner de la marca EPSON V550, analizadas y procesadas con el programa ImageJ (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA). Los resultados fueron expresados como porcentajes de la intensidad de proteína.

ESTUDIO *IN VIVO*

Se utilizaron 36 ratas machos de la cepa Wistar de 60 días y un peso de 200-300 g, siendo obtenidas de la Facultad de Medicina UNAM. Se utilizaron 6 ratas para cada grupo:

1. Grupo Control.
2. Grupo con andamio de gelatina más CEMP1-p3.
3. Grupo únicamente andamio de gelatina.

Los animales se anestesiaron y el procedimiento se realizó como se describe en Bu Serrano *et al*; con apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO1999⁹⁰. En general se realizó una incisión sobre la línea media de 3 cm sobre la calvaria, eliminando el periostio por completo de la superficie del hueso craneal. Se realizó un defecto de tamaño crítico (craneotomía) de 9 mm con una trefina y utilizando abundante irrigación de solución salina se extrajo el disco del hueso cortado sobre la calvaria con una sonda quirúrgica roma.

Fueron implantados los andamios con un tamaño de 9 mm de diámetro (Gelfoam-Pfizer; Upjohn, Kalamazoo, MI, EE. UU), tanto en los grupo control, como en los incluidos con 100 µg de CEMP1-p3 liofilizado. El sitio quirúrgico en todos los grupos fue cubierto con una membrana delgada de gelatina (S-100, satén hemostático absorbible; Lides, Ciudad de México, México) y fueron suturadas con seda negra 4-0⁹⁰. Por último los animales fueron sacrificados con dióxido de carbono posterior al día 30 y 60.

PROCEDIMIENTOS HISTOLÓGICOS Y ANÁLISIS EN LA REGENERACIÓN ÓSEA

Las calvarias fueron fijadas toda la noche en 10 % de Formaldehído⁹⁰⁻¹⁰⁰. Las muestras fueron descalcificadas con EDTA al 10% (pH 7.4) y disueltas en 0.5 % a 4° C durante 25 días, se deshidrataron en un tren de alcoholes y se embebieron en parafina realizando secciones de 5 µm de espesor. Las calvarias fueron seccionadas perpendicularmente de forma sagital a la sutura. Se utilizaron tres secciones que fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina para los análisis histomorfométricos que se realizaron en forma panorámica; además fueron teñidas otras 3 secciones con la técnica de Tricrómica de Masson. El área de tejido mineralizado se calculó utilizando el programa Zen Lite (Zeiss, Oberkochen, Alemania), para determinar la cantidad de hueso recién formado en cada defecto. El tejido formado en el área quirúrgica se examinó para todas las muestras mediante el microscópico de luz (Axioskope 2; Zeiss).

INMUNOFLUORESCENCIA

La expresión de marcadores moleculares sobre el hueso fue analizada por la neo formación en las calvarias de rata por una doble tinción de inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal de ratón anti IBSP, con anticuerpo policlonal anti OCN, BMP2/4, OSX y RUNX2 (Sanat Cruz Biothechnology). Los tejidos fueron fijados, descalcificados, embebidos en parafina, seccionados y montados en láminas de vidrio silanizadas, con la técnica ya descrita por Serrano *et al.*⁹⁰. Los cortes fueron pre-tratados con 10 % de suero de albúmina bovina en PBS por 1 hora a temperatura ambiente e incubadas con un anticuerpo primario 1:1000 por 12 hr a 4 °C. También se incubaron con un FITC-conjugado anticonejo IgG y Alexa-Fluor-594-conjugado anticonejo IgG (Thermo Fisher Scientific), como

anticuerpo secundario por una hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron evaluadas con un microscopio de fluorescencia (Axioskope 2; Zeiss), con las combinaciones de filtros apropiadas. Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario o por incubación en suero de conejo o ratón.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los ensayos de proliferación fueron realizados por triplicado y los datos fueron analizados por el test Neuman-Keuls post hoc ANOVA de 2 vías, utilizando las condiciones de tiempo y experimentales así como las variables independientes. Los ensayos de ALP y ARS se realizaron por triplicado; utilizamos una T de Student pareada y comparada con el grupo control con el experimental. Para el qRT-PCR se realizaron tres lecturas y los cambios fueron calculados los cambios en las intensidades por un análisis de C_t con el programa Rotor Gene 6000 Student (Qiagen), donde los valores de GAPDH y $d0$ se utilizaron como controles de normalización. Las pruebas t pareadas fueron utilizadas para comparar el grupo control con el experimental. Para analizar los Western Blot, todas las membranas se digitalizaron con un escáner de la marca Epson V550 (Epson America, Long Beach, CA, USA), se procesaron y analizaron con el programa ImageJ (NIH). Los valores relativos de cada proteína fueron evaluados midiendo la intensidad integrada de los pixeles en cada banda. Los resultados fueron expresados en porcentajes de la intensidad de proteínas presentes. Tres medidas fueron tomadas para cada grupo. Se utilizó ANOVA de una vía como variable independiente y GAPDH como control de normalización

En el análisis estadístico de la histomorfometría se utilizaron 2 animales de cada grupo. Como control se utilizó el tejido eliminado durante el procedimiento quirúrgico. Las pruebas T pareadas se utilizaron para comparar los grupos control y experimentales. Todos los resultados son evaluados mediante Desviación Estándar y un valor de $P = 0.05$ será considerado estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU).

RESULTADOS

El análisis *in silico* muestra que el péptido CEMP1-p3, está constituido por dos sitios aleatorios situados a los extremos y una alfa hélice en la parte media (Fig. 3), está conformado por 20 aminoácidos, presenta un pI (punto isoeléctrico) de 8.1, el peso molecular teórico es de 1.98 kDa y muestra una tendencia hidrofílica. Cuenta con la presencia de un grupo imidazol en la histidina, grupos carbonilo presentes en la glutamina, glicina, prolina y lisina así como grupos metilo en la isoleucina, alanina y valina importantes en la unión a la superficie de la HAp .

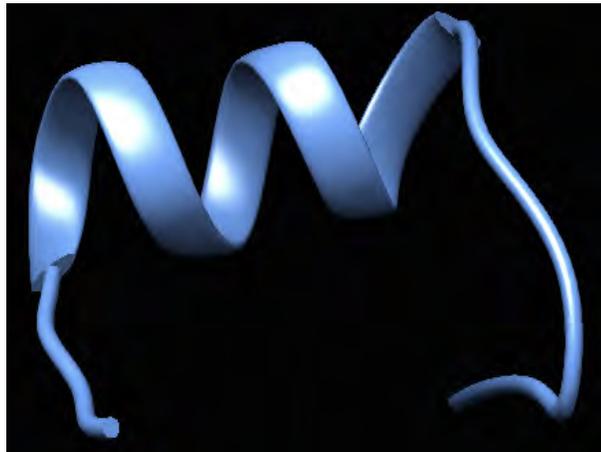


Figura 3. Configuración tridimensional teórica del péptido CEMP1-p3 obtenida por USFC Chimera.

Es importante en el estudio de moléculas dirigidas al área de bioingeniería de tejidos el uso de diferentes temperaturas para analizar su comportamiento y la formación de agregados moleculares. El análisis por Dispersión de Luz Dinámica (DLS) a una temperatura de 20 °C mostró una población polidispersa con tamaños que van de 0.1 nm hasta 1.1 μm, a 32 °C se observaron poblaciones polidispersas de agregados moleculares con tamaños entre 1-10, 100 y 1000 nm, sin embargo bajo una temperatura de 37 °C (Fig. 4) la población resultante es monodispersa y la formación de oligómeros aumentó, con tamaños aproximados entre los 200 y 400 nm, estabilizando el tamaño de partículas del péptido.

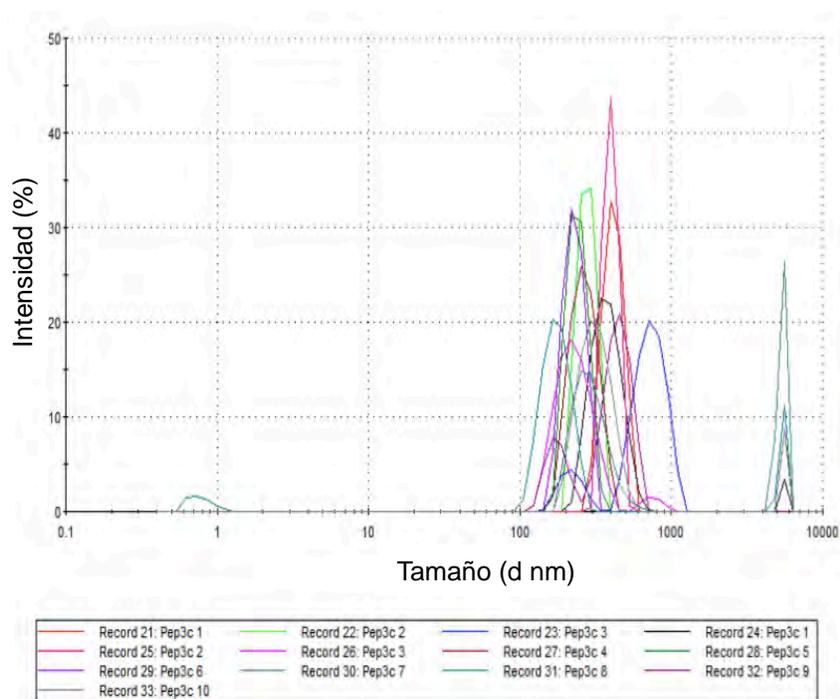


Figura 4. Análisis por DLS del péptido CEMP1-p3 con un pH de 7.4 y temperatura a 37°C.

Ya determinada la importancia de la temperatura, decidimos evaluar que concentración del péptido utilizar en nuestros próximos ensayos. Se realizó un experimento por composición constante donde fueron utilizadas diversas concentraciones del péptido CEMP1-p3 a 2.5, 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$ y evaluadas durante el crecimiento de cristales de HAp y un grupo control sin la presencia del péptido. En la gráfica se observa que la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ del péptido promueve considerablemente el crecimiento de cristales de HAp comparado con la concentración de 15 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo en la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ el efecto fue inhibitorio incluso comparado con el grupo control (Fig. 5).

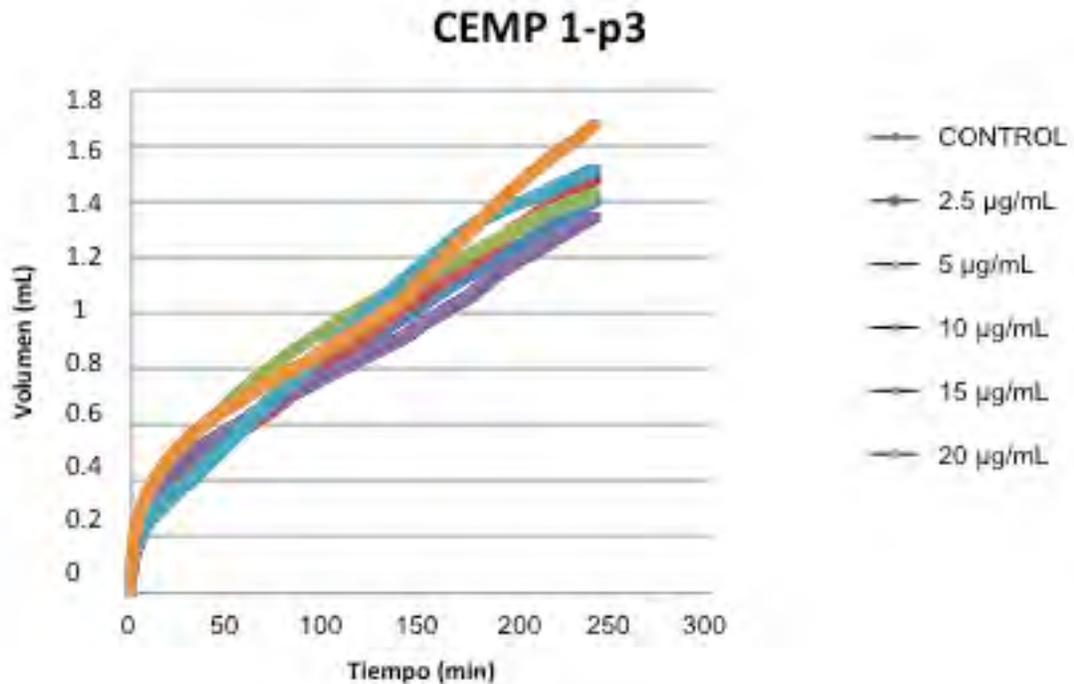


Figura 5. Ensayo de crecimiento por titulación constante donde se observa el efecto ante diversas concentraciones del péptido CEMP1-p3.

Una vez establecido que bajo la concentración de 20 µg/ml de CEMP1-p3 funciona como promotor en el crecimiento de cristales de HAp, evaluamos su capacidad para promover la nucleación de cristales de fosfato de calcio mediante un sistema de contradifusión libre de células, este es un sistema versátil y práctico el cual, permitió bajo una concentración 129 mM de CaCl₂, pH 7.2 y una temperatura de 37 °C determinar el potencial de péptido para promover el crecimiento de cristales de fosfato de calcio en un periodo de 7 días. Posteriormente los cristales fueron recolectados en un Microscopio Estereoscópico con una punta de tungsteno para su análisis por diversas técnicas de microscopía y espectroscopía

Las muestras fueron observadas en FE-SEM y analizadas por la técnica de EDS y mapeo de elementos en distintas zonas de las esférulas recolectadas, con la finalidad de establecer su relación Calcio/Fósforo. La cantidad de elementos traza ubicados sobre la parte interna se van perdiendo hacia la superficie además de observar la maduración progresiva de los cristales (Fig. 6) utilizando electrones secundarios, las esférulas tienen un tamaño promedio de 500 a 700 μm , bien ordenadas y conformadas por prolongaciones con tamaños aproximados de 1-3 μm y un grosor de 0.5-1.5 μm . Estas prolongaciones están agrupadas en varias láminas en forma de “agujas” y “escamas” orientadas hacia un mismo eje formando ángulos entre 90- 120 ° y las cuales emergen de una capa que separa estas láminas de un centro o núcleo en común (Fig. 7).

Este núcleo tiene un tamaño menor a 200 μm , algunos se encuentran agrupados por múltiples fibras desorganizadas y otros por una superficie lisa en la cual se muestran depósitos irregulares (Fig. 8). Por electrones retrodispersados se observa un mismo contraste de tonos grises en las esférulas, sin embargo al realizar una mayor amplificación cercana a los 7000 x se aprecia un cambio en el contraste de grises sobre las caras laterales de las láminas cristalinas, indicando la presencia de composición química diferente.

Un experimento complementario con el péptido modificando el pH a 6.8 y 8.2 (Fig. 9) utilizando las mismas condiciones experimentales, se demostró por FE-SEM que utilizando pH 6.8 se obtuvo la formación de barras longitudinales de 800 μm a 1 mm de longitud de forma irregulares, las cuales tenían aspecto moteado en la superficie y presentaban una relación calcio fósforo de 1.12; por otro lado, con un pH de 8.2 se formaron pequeñas esférulas con tamaños aproximados de 100 a 200 μm que presentaban en la superficie pequeñas láminas en forma de hojuelas irregulares además de una relación calcio fósforo de 1.36.

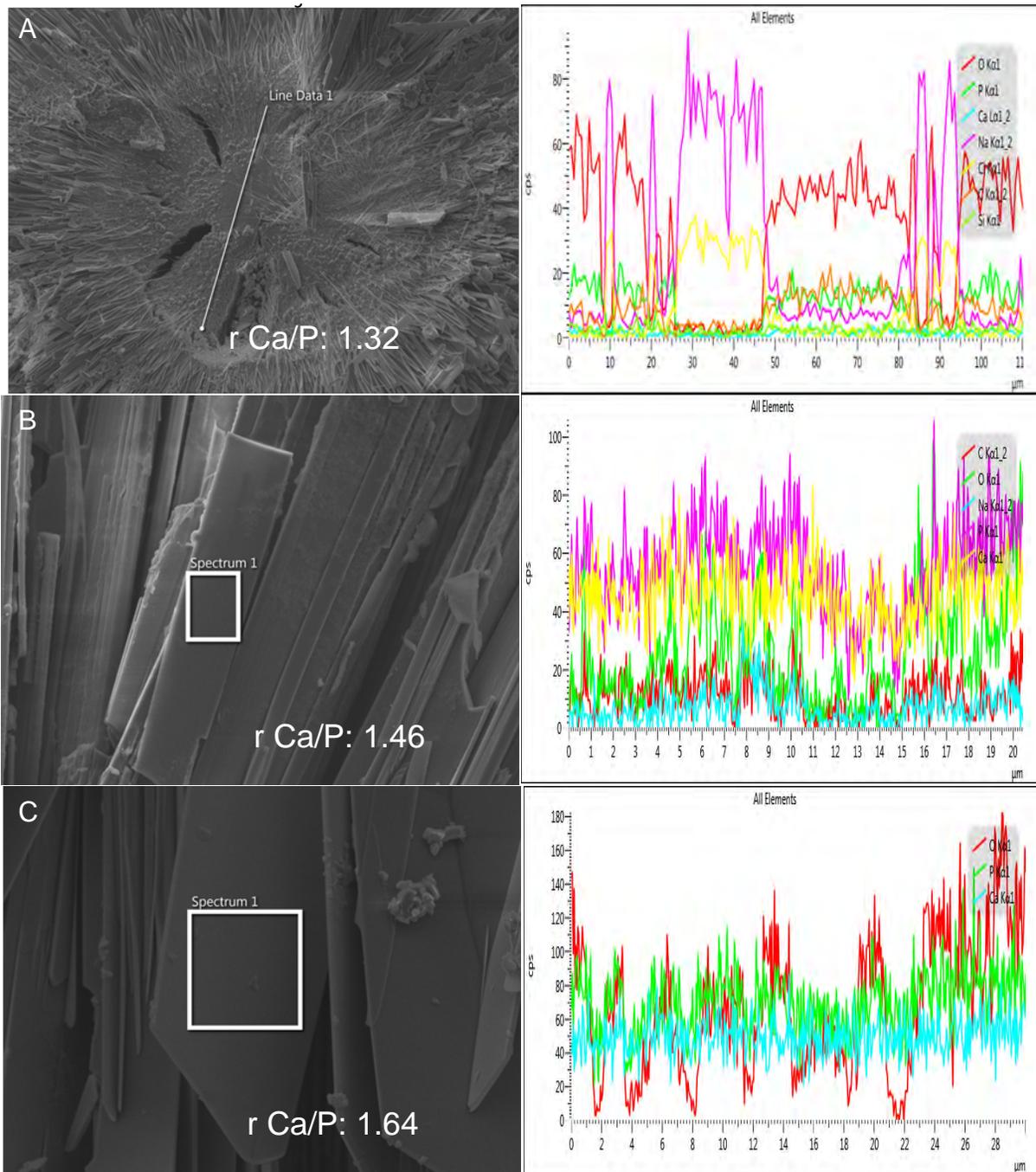


Figura 6. Análisis por EDS puntuales (izquierda) y mapeo de elementos (derecha) por medio de FE-SEM sobre distintas zonas de un cristal, en (A) la relación calcio fósforo corresponde a la fase mineral Fosfato dicálcico monohidratado, en (B) es Fosfato Octacálcico y en (C) la fase mineral es HAp.

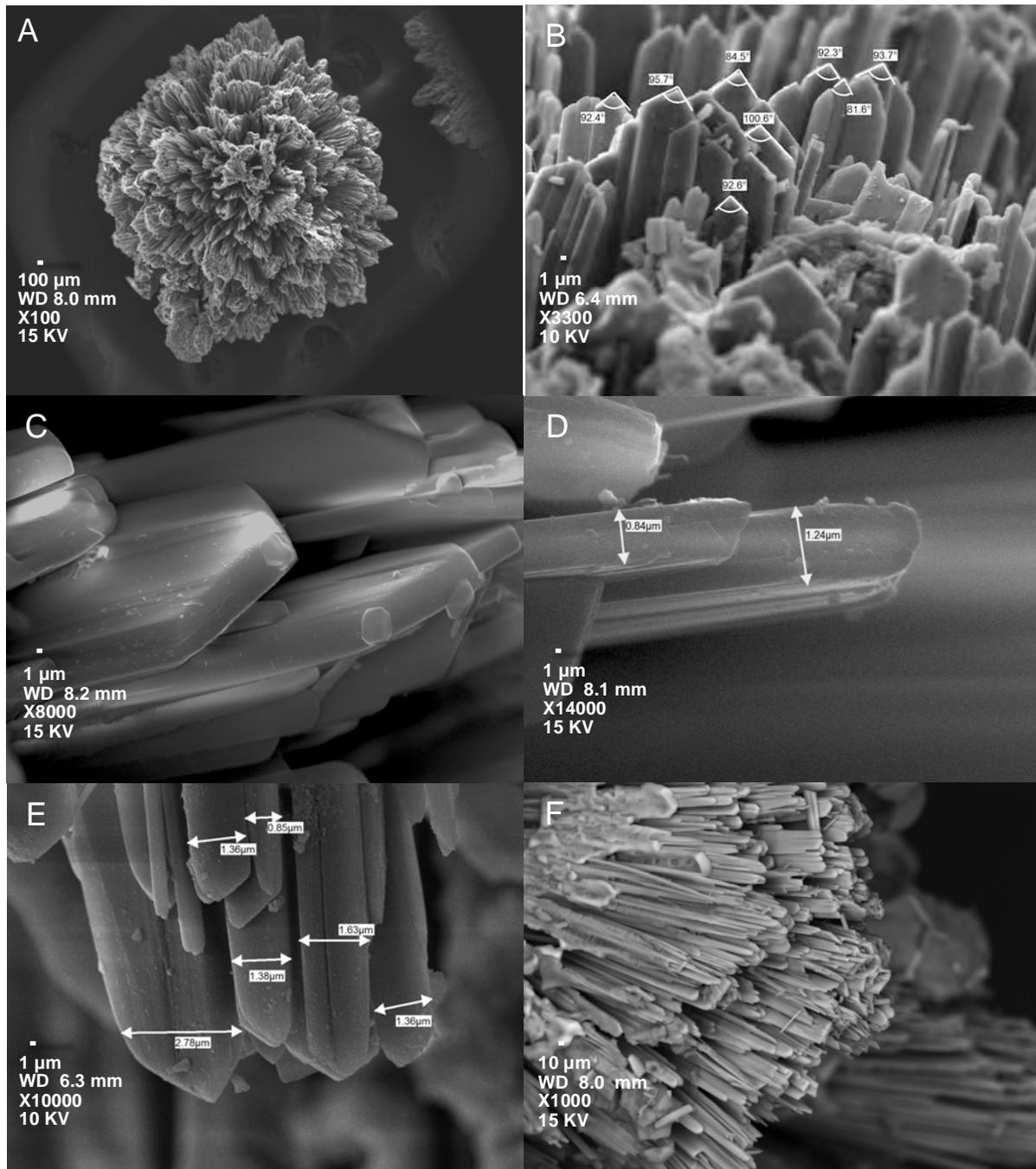


Figura 7. Micrografías por FE-SEM donde se observa una esférula con un tamaño aproximado de 700 μm (A), organizada por láminas las cuales muestran ángulos que van de 90 a 100° (B) con un mismo eje de crecimiento en forma de lancetas (C). Los extremos de estas láminas presentan un grosor aproximado de 1 μm (D) y un tamaño entre 1-2 μm (E) agrupadas de forma conjunta (F).

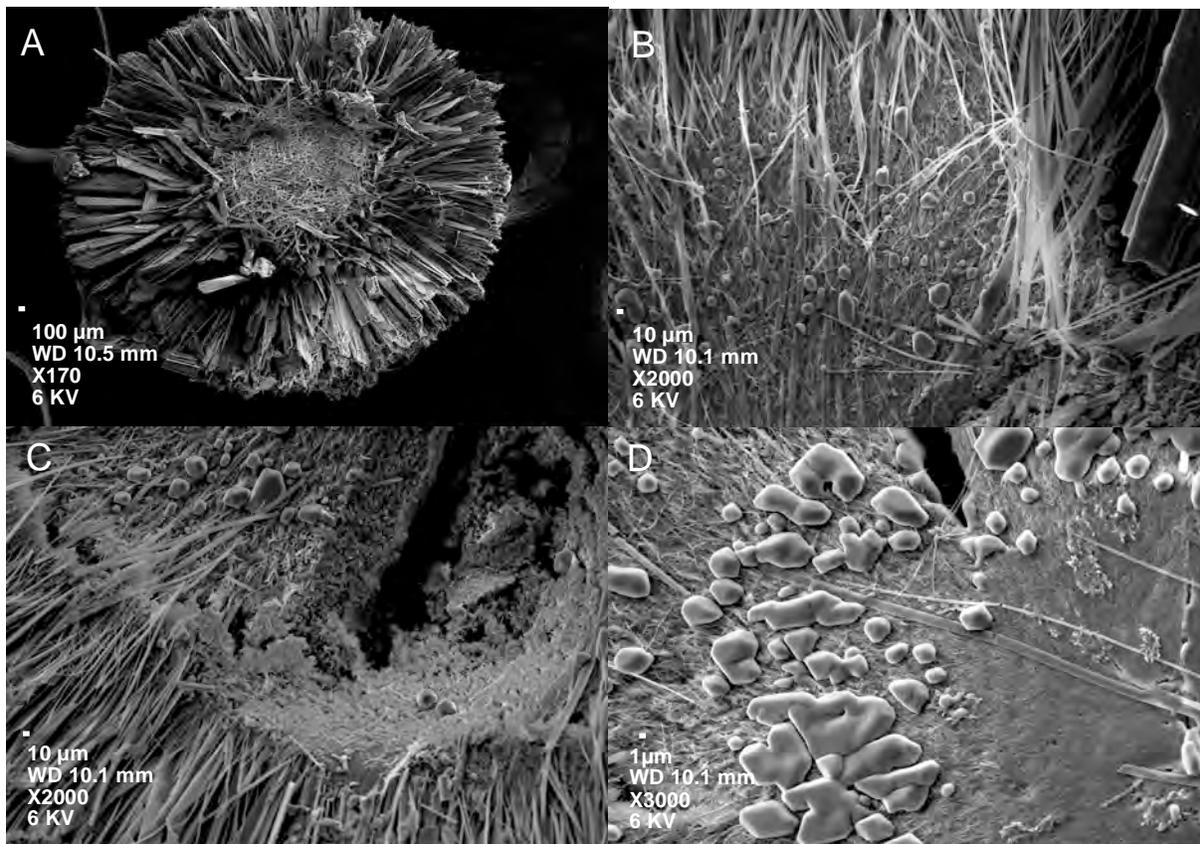
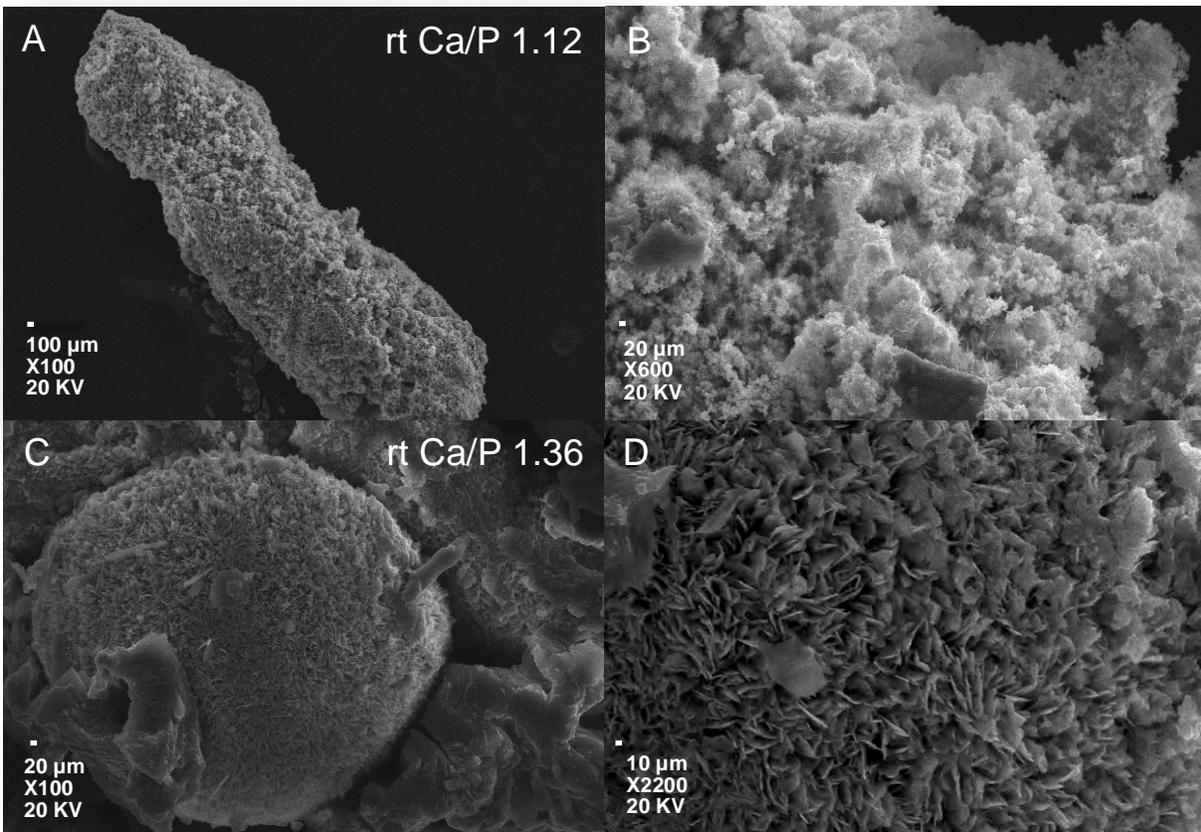


Figura 8. Microfotografía por FE-SEM de la parte interna de una esférula (A). Las láminas que conforman al cristal se insertan hacia el núcleo (B), el cual está constituido por una superficie irregular (C) en la cual crecen estructuras irregulares inferiores a 1 μm (D).

Dentro de la secuencia del péptido existen aminoácidos que están involucrados en el acoplamiento y auto ensamblaje de otras proteínas relevantes en el proceso de mineralización como alanina, ácido glutámico, valina y prolina por lo que empleamos el mismo sistema de contradifusión bajo condiciones fisiológicas. Al analizar las muestras por electrones secundarios, observamos la formación de barras y pequeñas esférulas, constituidas por láminas aciculares desorganizadas, con extremos romos que al realizarles EDS, mostraban una relación calcio fósforo cercana a 1.32 (Fig. 10).



F

Figura 9. Imágenes por FE-SEM del péptido CEMP1-p3 donde (A y B) corresponden a un pH 6.8, donde se observan estructuras en forma de barras irregulares las cuales están constituidas por una morfología moteada e irregular. Utilizando un pH 8.2 la morfología cambió a pequeñas esférulas compuestas de láminas en forma de pequeñas hojuelas distribuidas sin organización (C y D).

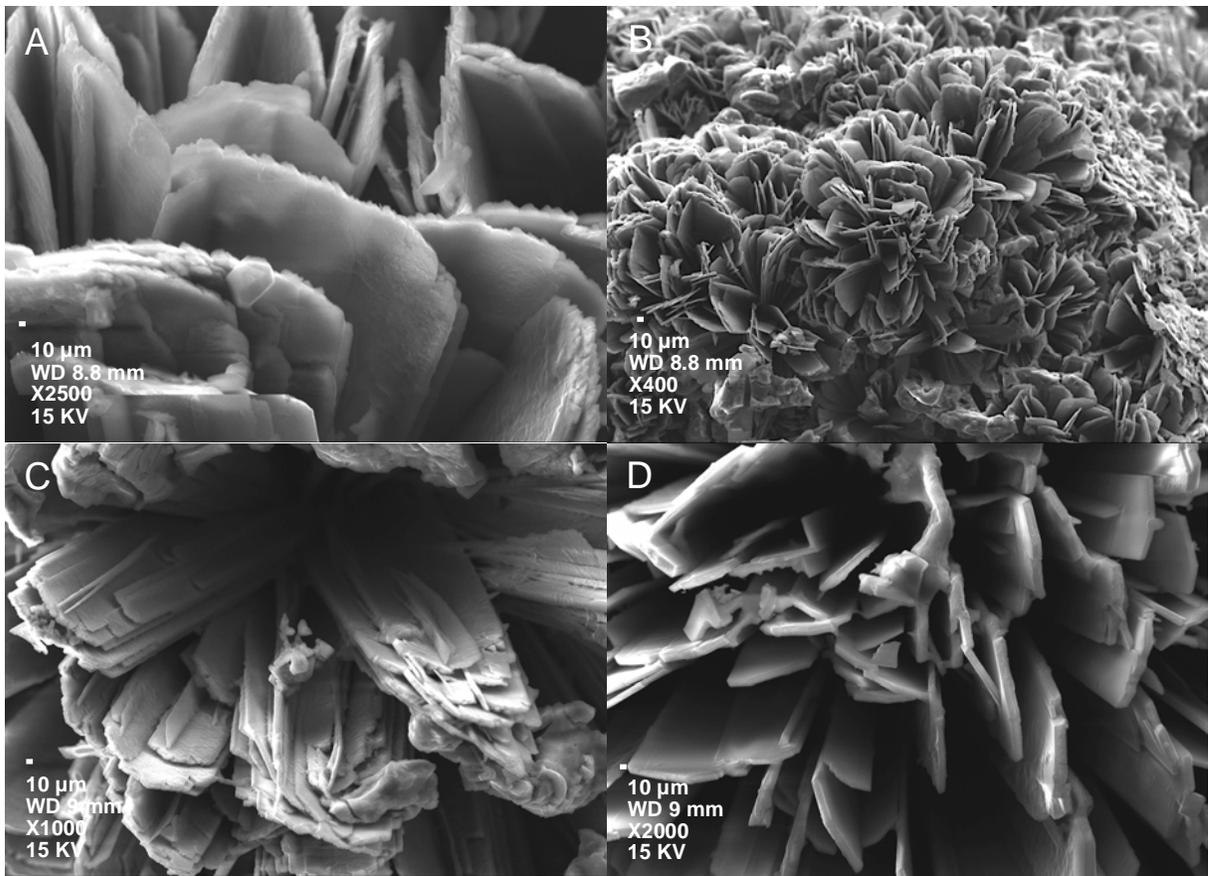


Figura 10. Imagen por FE-SEM, de los cristales formados por medio del sistema de contradifusión, utilizando aminoácidos relevantes en el crecimiento de HAp. (A) alanina, (B) ácido glutámico, (C) valina y (D) prolina.

Para determinar la fase mineral de los cristales de fosfato de calcio, estos fueron analizados por HRTEM. Utilizando la Transformada de Fourier fue posible identificar los planos cristalinos correspondientes (101) y (001) con un eje de zona [0-10] y distancias interplanares de 0.289 nm, 0.264 nm y 0.347 nm respectivamente. Estos parámetros fueron comparados con la tabla internacional de cristalografía PDF #860740 ya reportada y que corresponde a la fase cristalina de HAp (Fig. 11).

Mediante la técnica de Difracción de Rayos X evaluamos la presencia de planos cristalinos correspondientes a (002), (1-11) y (010) los cuales son correspondientes a OCP cuyo número de catalogo es PDF 44-0778 y la fase mineral de Cloruro de Sodio NaCl, correspondiente al número de catálogo PDF 88-2300 cuyas reflexiones se observan en el plano (222) (Fig. 12)

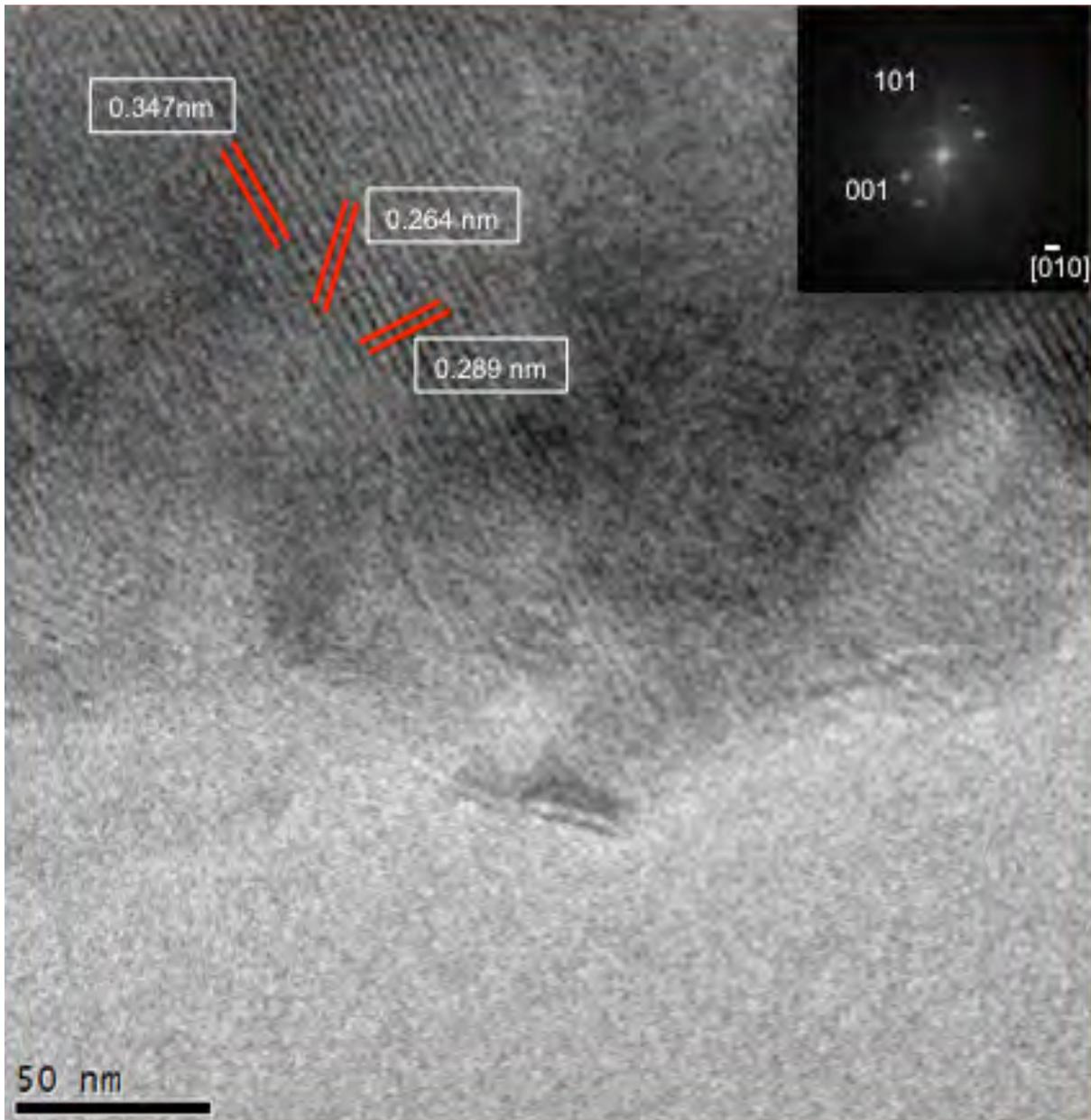


Figura 11. Imagen de un cristal del péptido CEMP1-p3, por HRTEM donde se observa la traslocación de otros planos cristalinos, esto podría indicar la formación de otra fase mineral distinta a la HAp.

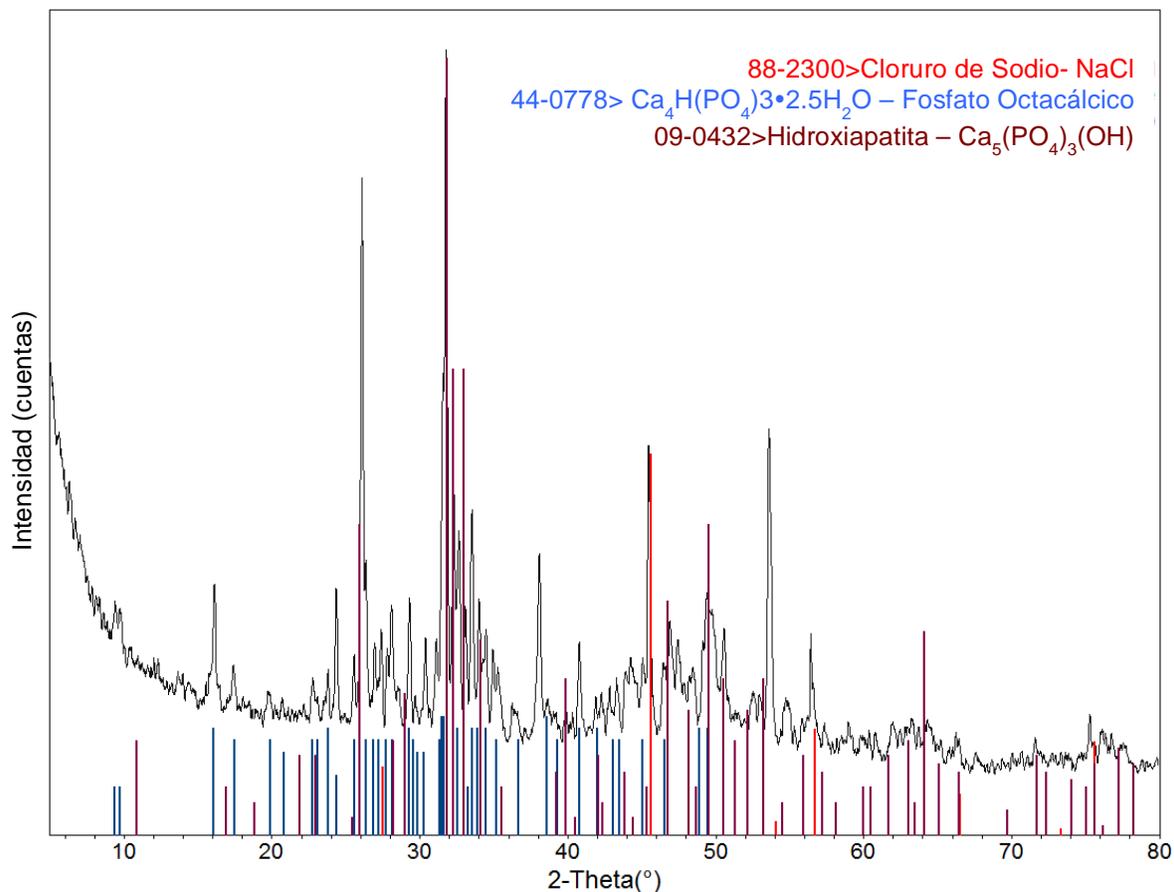


Figura 12. Difractograma de Rayos X correspondientes a los cristales de fosfato de calcio del péptido CEMP1-p3 obtenidos por el sistema de contradifusión.

Una vez establecida la fase mineral, decidimos analizar la presencia de grupos funcionales del péptido relevantes para la formación de HAp, los resultados sobre la muestra de péptido en solución mostraron estiramientos simétricos en los modos vibracionales 3364, 3289, 2970, 2566, 2455, 1323, 901, 926, 963 y 840 cm^{-1} . Deformación asimétrica en 1452 cm^{-1} , estiramiento asimétrico en 1077 y 1088 cm^{-1} (Fig. 13 y Tab. 1).

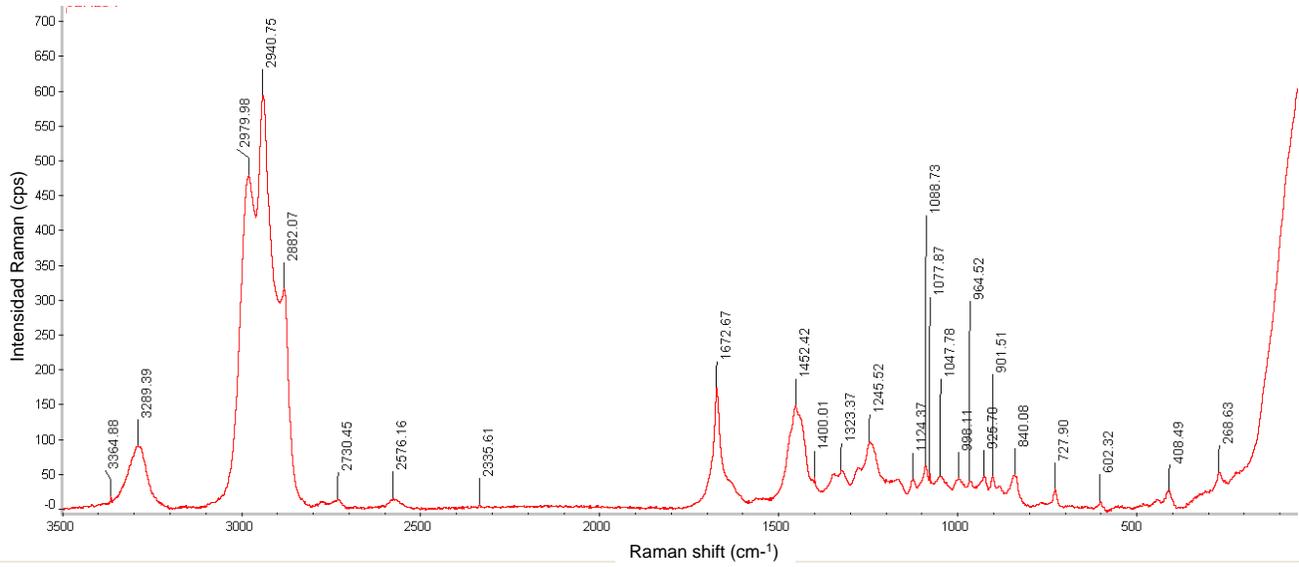


Figura 13. Análisis por micro Raman del péptido CEMP1-p3 en solución, se observan grupos funcionales de aminoácidos presentes en el péptido.

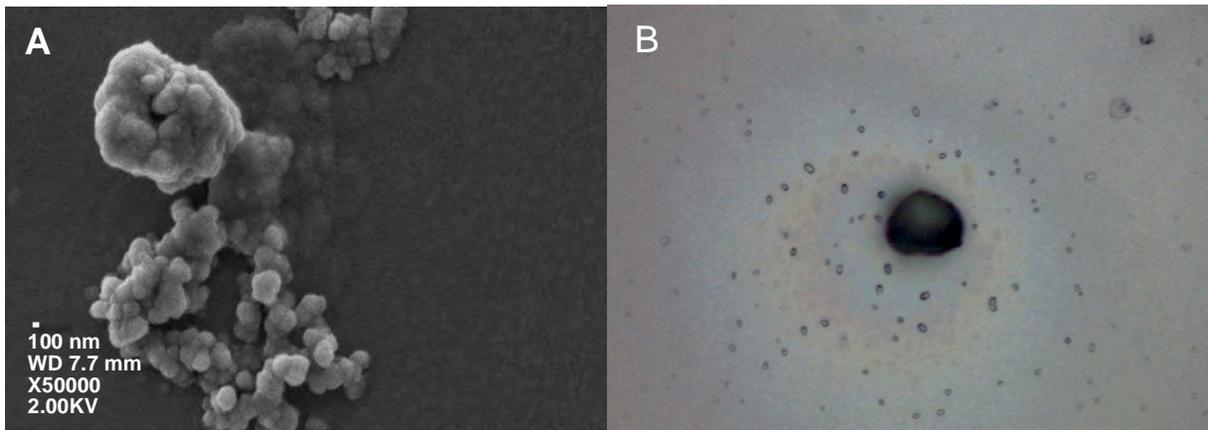


Figura 14. Por medio de FE-SEM (A) y el Microscopio Estereoscópico se observa al péptido CEMP1-p3 en solución, el cual muestra la formación de pequeñas unidades monoméricas con un tamaño inferior a 100 nm hasta la formación de unidades más grandes en forma de oligómeros.

Frecuencia cm ⁻¹	Estructura
3300-3500	$\nu(\text{NH}_2)$
3100-3400	$\nu(\text{O-H})$
2800-3000	$\nu(\text{C-H})$
2300-2600	$\nu(\text{N=N})$
1500-1900	$\nu(\text{NH}_3)$
1400-1470	$\delta(\text{CH}_3)$
1323-1401	Histidina NtH3. (24), C-rock. (15), Ct-C-H (10)
1000-1250	$\nu(\text{C=S})$
1200-1300	<i>Enlace amida III</i> <i>Posible formación random</i> <i>coli y α hélice</i>
1060-1150	$\nu(\text{C-O-C})$
800-970	$\nu(\text{C-O-C})$
835-840	Alanina
408-413	$\nu(\text{S-S})$

Tabla 1. Frecuencias y modos vibracionales del péptido CEMP1-p3 en solución.

Se observó la morfología del péptido en solución mediante FE-SEM y microscopía estereoscópica donde se apreciaron nano esferas menores a 50 nm las cuales se agrupaban en aglomerados mayores a 200 nm (Fig. 14). Al analizar por micro Raman los cristales de fosfato de calcio, mostraron diferencia comparados con el grupo control siendo representativo de este un grupo no apatita en la frecuencia 1077 cm^{-1} ; mientras que el experimental correspondiente a CEMP1-p3 se observaron estiramientos simétricos en las frecuencias 957 cm^{-1} siendo esta frecuencia muy intensa y definida, en 422 cm^{-1} y un estiramiento asimétrico 589 cm^{-1} muy intenso y definido característicos de la HAp (Fig. 15 y Tab. 2).

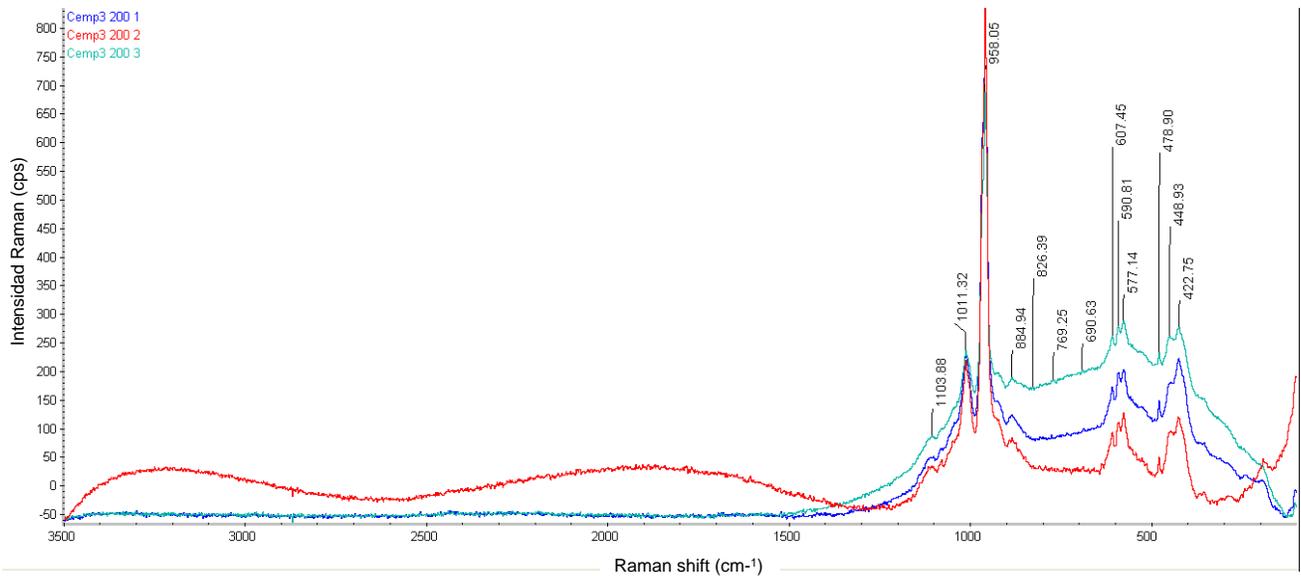


Figura 15. Espectro por micro Raman sobre cristales del péptido CEMP1-p3.

Frecuencia cm^{-1}	Estructura
1000-900	$\text{V}_1\text{HPO}_4^{-3}$
954-957	$\text{V}_2\text{HPO}_4^{-3}$
419-423	$\text{V}_3\text{HPO}_4^{-3}$
584-589	$\text{V}_4\text{HPO}_4^{-3}$
1077	$\text{V}_3\text{HPO}_4^{-3}$ no apatita

Tabla 2. Se observan frecuencias de grupos fosfato presentes en los cristales del péptido CEMP1-p3 característicos de la HAp y un estiramiento asimétrico de un grupo no apatita en la frecuencia 1077 cm^{-1} correspondiente al control negativo.

Analizamos la topografía superficial sobre un cristal mediante la técnica de AFM, y observamos el extremo de una lámina de las esférulas recolectadas. Mediante un campo de trabajo de $1.2 \times 3 \times 3 \text{ }\mu\text{m}$, corroboramos que las prolongaciones presentan una superficie lisa y están agrupadas en varias láminas delgadas con un tamaño aproximado de 100 - 200 nm las cuales se encuentran ensambladas por nano prismas de forma cilíndrica de 20 – 30 nm dispuestos verticalmente logrando una amplificación de la imagen hasta 735 nm (Fig. 16).

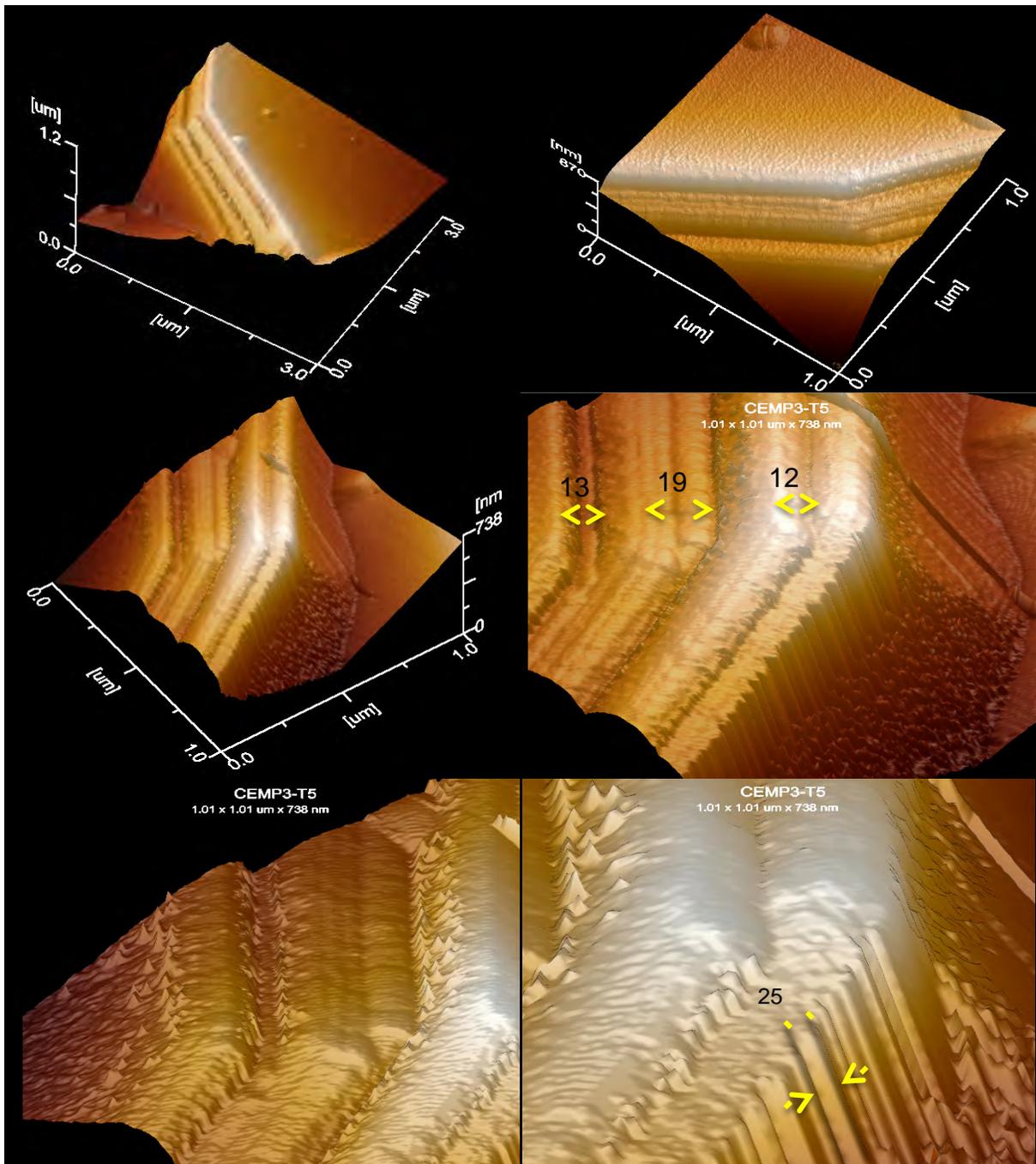


Figura 16. Imágenes tridimensionales obtenidas con el programa WinSP process sobre un cristal de fosfato de calcio por medio del sistema de contradifusión del péptido CEMP1-p3.

En los estudios de proliferación de HuPLCs mediante los ensayos de MTT, observamos que a 5 µg/ml el péptido de CEMP1-p3 promueve la proliferación celular en un 93, 60, 83 y 91 % en los días 1,2,3 y 4 respectivamente, comparado con el control positivo (Fig. 17).

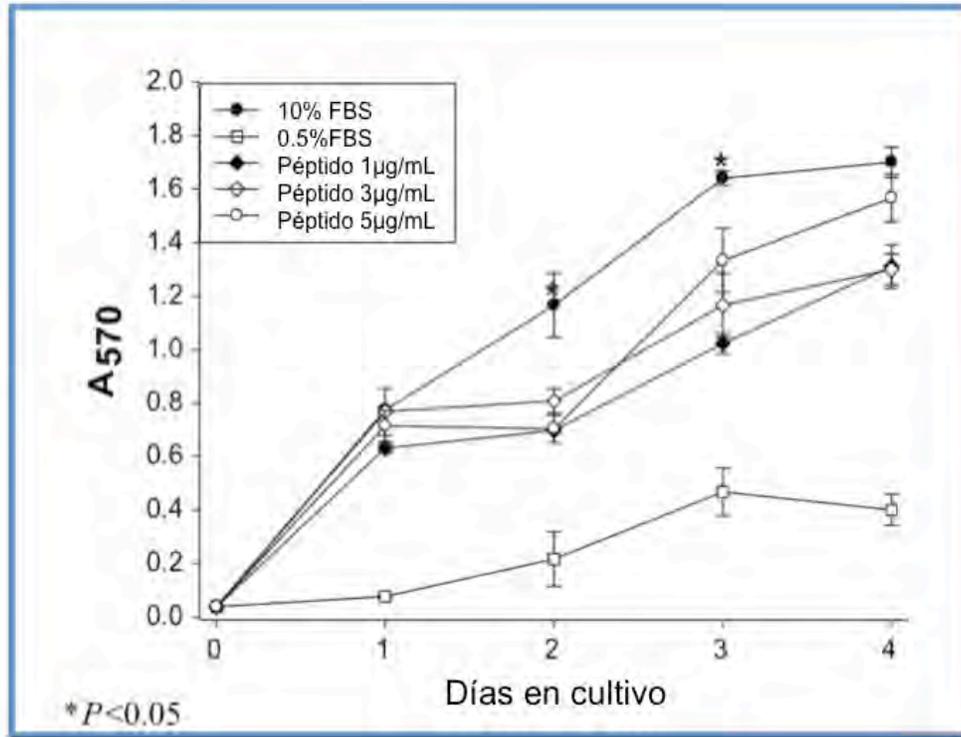


Figura 17. Gráfica donde observamos que el péptido de CEMP1-p3 promueve la proliferación de células HuPLC en una concentración de 1, 3 y 5 µg/ml.

Las células HuPLCs tratadas con el péptido a una concentración de 5 µg/mL en un tiempo de 5 y 15 días mostraron el incremento de la actividad de fosfatasa alcalina específica en un rango de 3.2 a 2.8 veces respectivamente comparado con el grupo control, estas diferencias son estadísticamente significativas (Fig. 18).

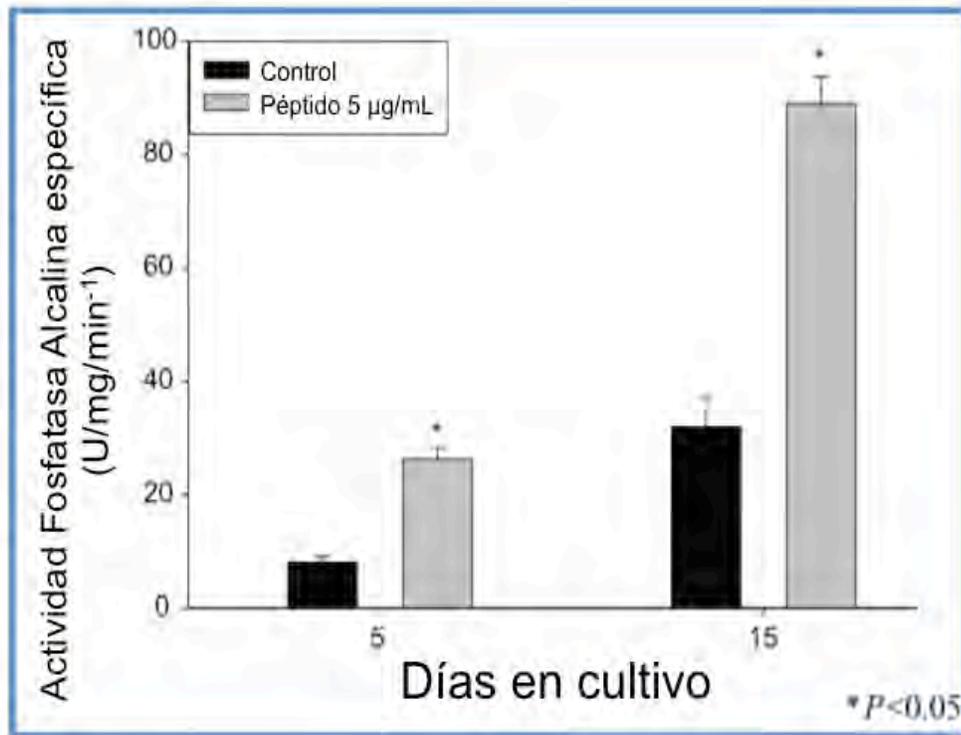


Figura 18. Incremento en la actividad de la ALP específica por el péptido de CEMP1-p3 en HuPLC en un tiempo de 5 y 15 días.

Por otro lado se demostró que el péptido CEMP1-p3 a una concentración de 5 µg/ml induce la formación de nódulos de calcio en las células HuPLCs tratadas con este a diferencia del grupo control (Fig. 19-A). La cuantificación de la tinción por el método de CPC demostró resultados relevantes; comparados los grupos de células HuPLC (1.9-, 2.0- y 2.1 veces a los días 2, 10 y 15) con el grupo control (Fig. 19-B).

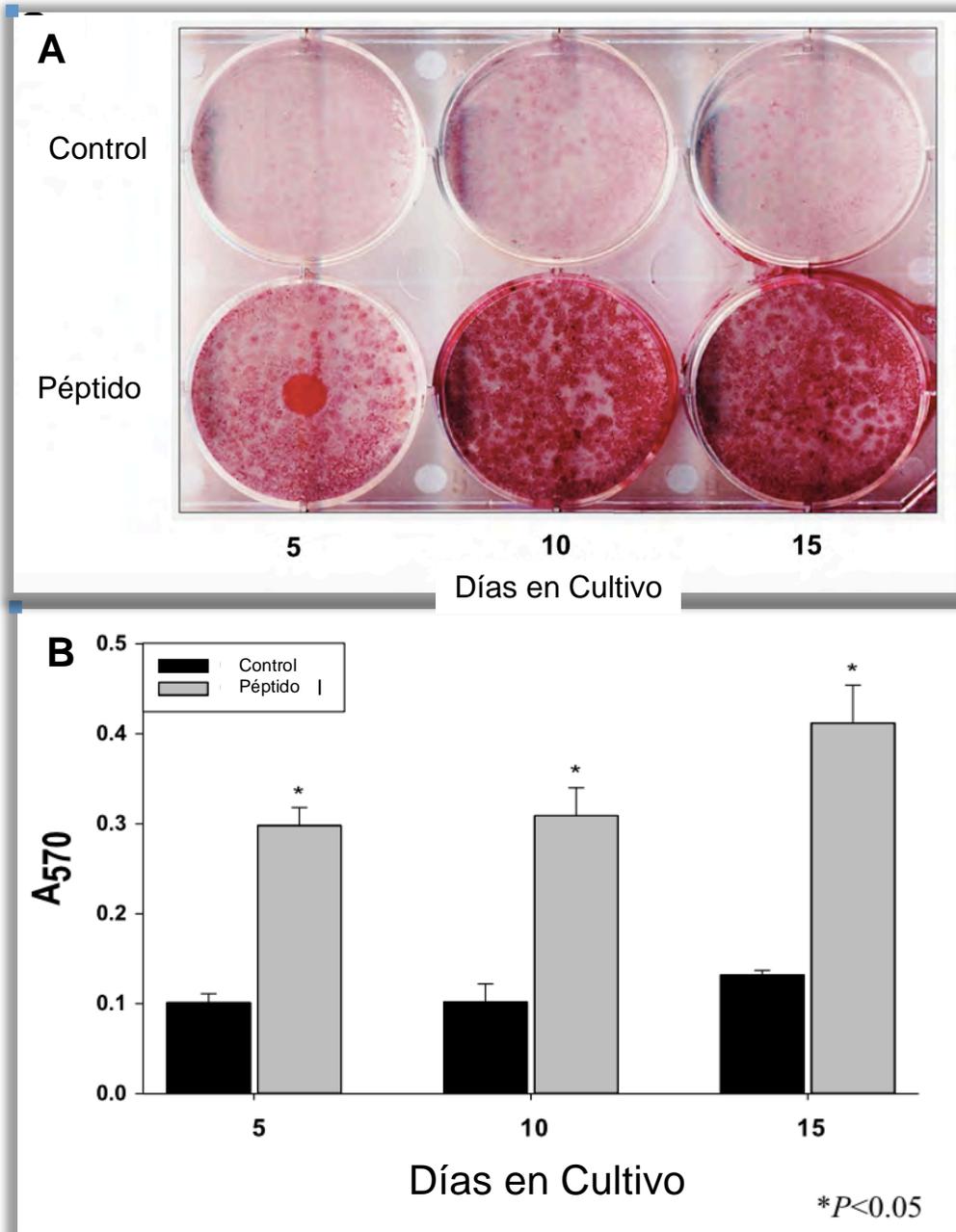


Figura 19. Cultivos celulares de HuPLCs a 5, 10 y 15 días (A) fijados y teñidos. Posteriormente se realizaron mediciones cuantitativas con CPC (B). Todos los experimentos y mediciones se realizaron por triplicado.

La expresión de marcadores moleculares relacionados a hueso en HuPLCs a los 5, 10 y 15 días mostraron que BMP2 alcanza su mayor expresión en etapas iniciales de la mineralización. RUNX2 fue expresada ocho veces más que los grupos controles en los días 10 y 15. OSX alcanza la expresión de su pico de ARN mensajero al día 10 e IBSP en el día 15 durante la etapa final de mineralización. La OCN muestra un incremento en la expresión

en el día 10 y 15 (15 y 25 veces respectivamente) comparado con los grupos controles. El ARN mensajero de CEMP1 esta incrementado hasta 25 veces más en el día 10, indicando el importante papel del péptido para inducir la diferenciación de HuPLCs hacia un fenotipo mineralizado (Fig. 20).

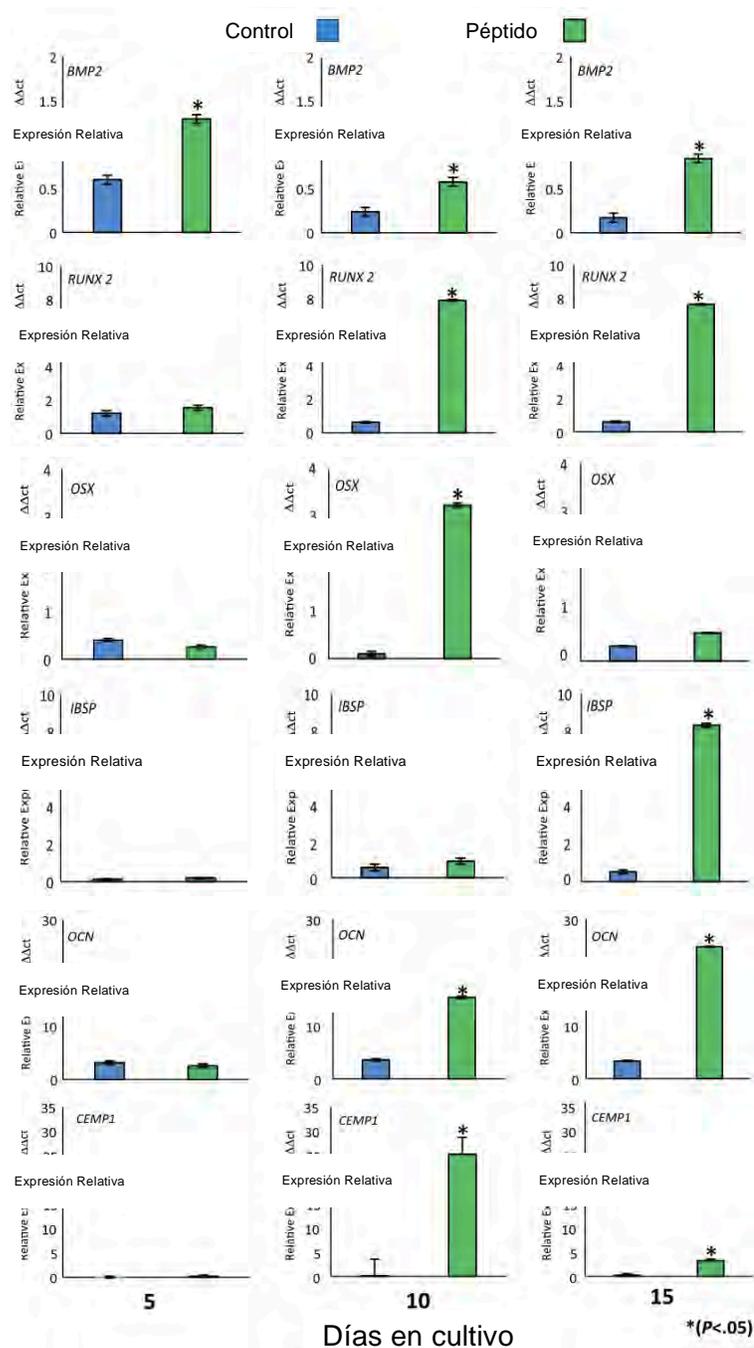


Figura 20. Expresión de genes relacionados con marcadores moleculares para hueso en HuPLCs expuestas al péptido CEMP1-p3 en los días 5, 10 y 15 días

El efecto del péptido CEMP1-p3 sobre la diferenciación de HuPLC hacia un fenotipo mineralizado fue complementado por Western Blot. La expresión de proteínas relacionadas a hueso y CEMP1 analizadas en los días 5, 10 y 15, mostraron que los cultivos de HuPLC tratados con el péptido, incrementan la expresión de marcadores celulares osteoprogenitores. RUNX2 fue expresado por las células tratadas con el péptidos en todo el tiempo experimental, OSX fue expresada 1-, 2.4- y 3.8 veces más en los días 5, 10 y 15. En conjunto estos marcadores son denominados como factores osteogénicos. IBSP fue expresada de 2- y 3- veces en los días 5 y 10 respectivamente. En el día 15 presentó cerca de 2.7- veces la expresión comparada con los grupos controles. BMP2 fue expresada únicamente por HuPLC tratadas con el péptido, por lo que pensamos que el efecto es positivo en la expresión de CEMP1 casi 6.7-, 4.6- y 5.8- veces en los días 5, 10 y 15 (Fig. 21).

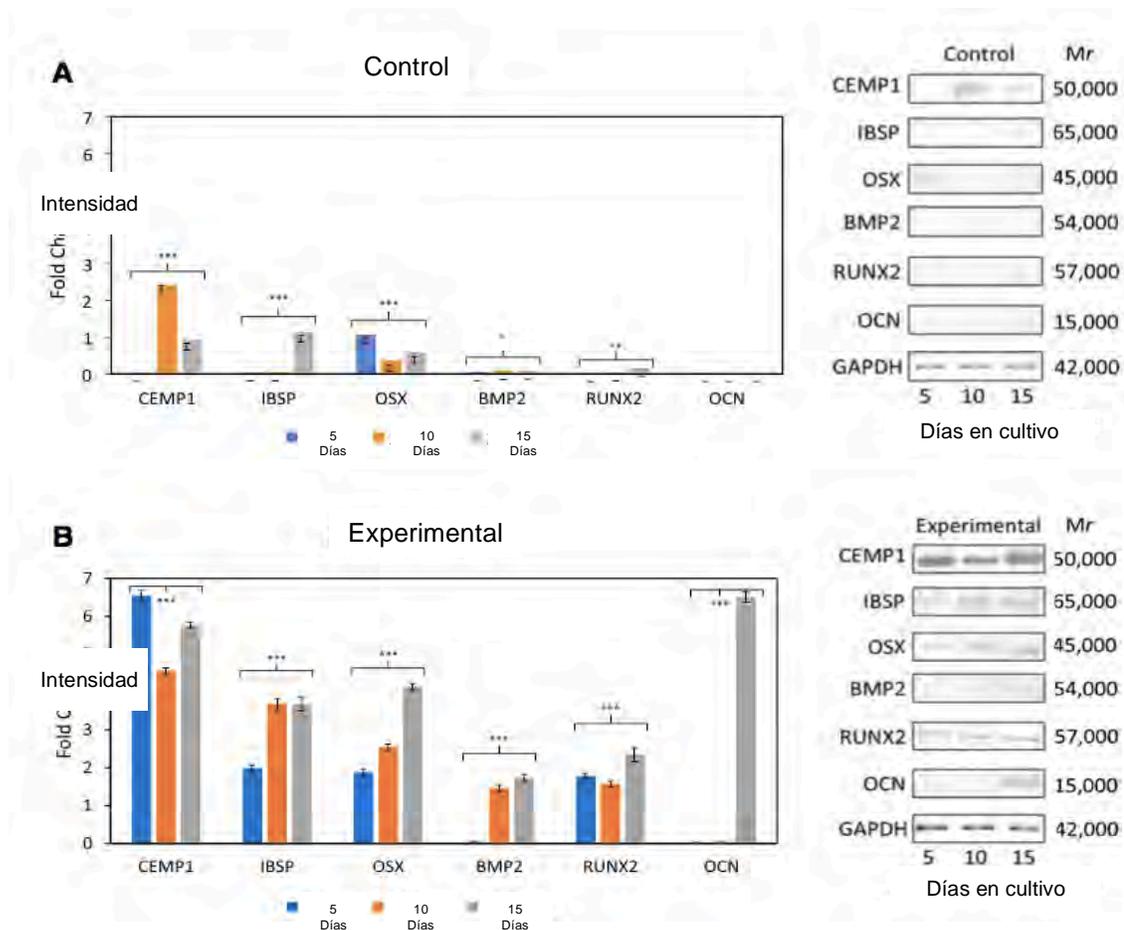


Figura 21. (A) Controles sin péptido, en (B) Expresión de marcadores moleculares en cultivos de HuPLC tratados con 5 µg/mL de péptido CEMP1-p3.

Para determinar si el péptido CEMP1-p3 inducía la formación de hueso *in vivo*, se realizaron defectos de tamaño crítico en calvarias de rata Wistar y las muestras fueron colectadas a los 30 y 60 días; en ambos grupos no hay evidencia de respuesta inflamatoria. Posterior al día 30 de la cirugía; los grupos con y sin andamio mostraron un crecimiento de tejido conectivo fibroso, sin evidencia de formación de un tejido óseo. Por otro lado los andamios con el péptido mostraron la formación parcial del defecto craneal con la neoformación de un tejido similar al hueso. Por otro lado, los defectos tratados con el péptido CEMP1-p3 posteriores al día 60 de la cirugía, mostraron que los defectos fueron llenados en su totalidad con un tejido que muestra las mismas características del hueso normal; en este grupo experimental los controles (andamio con y sin gelatina) solo presentaron una capa gruesa de tejido conectivo sin la formación de estructuras óseas. (Fig. 22).

En el análisis histológico se observa la presencia de un tejido similar al hueso lamelar con la presencia de osteocitos en sus lagunas y células parecidas a osteoblastos recubriendo la nueva formación ósea en los días 30 y 60 días posteriores a la cirugía (Fig. 23).

El análisis histomorfométrico realizado con la tinción de hematoxilina y eosina en las muestras con CEMP1-p3, demostró una formación estadísticamente significativa de hueso nuevo (61 ± 2.19 y $82 \pm 1.97\%$) en los días 30 y 60 respectivamente. Los defectos con el andamio de gelatina sin péptido, mostraron únicamente 5.16 ± 1.13 y $18.08 \pm 0.74\%$ la formación de hueso a los 30 y 60 días respectivamente. De manera similar los defectos sin tratamiento mostraron la formación de un anillo de hueso a la periferia del defecto al día 30 y 60 $12.62 \pm 0.42 \pm$ y $23.43 \pm 1.39\%$ respectivamente (Fig. 24).

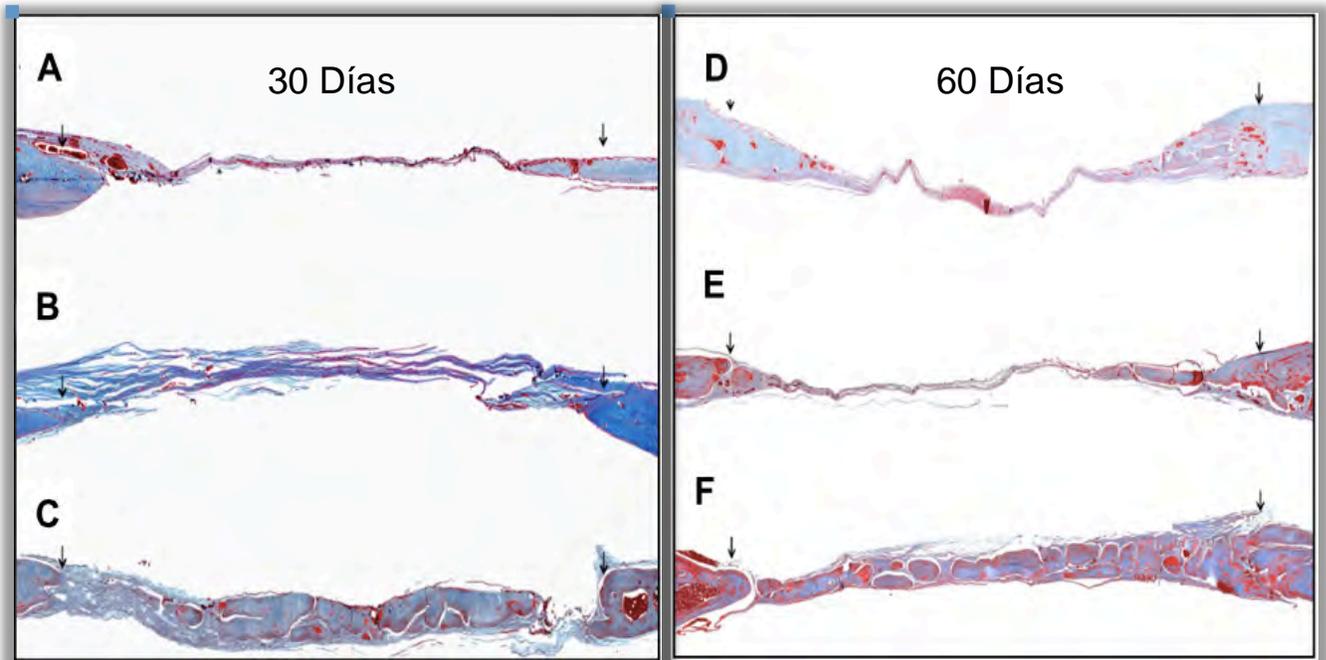


Figura 22. Microfotografía 200 X de secciones histológicas sobre calvaria de rata, utilizando la tinción de Tricrómica de Masson posterior al día 30 y 60 de tratamiento con CEMP1-p3. Los grupos controles con y sin andamio presentan el crecimiento de una capa tejido conectivo fibroso sin evidencia de la formación ósea (A,B) En el grupo experimental con CEMP1-p3 mostró el llenado parcial del defecto con la formación de hueso nuevo (C). Posterior al día 60, el control sin andamio (D) y el control con gelatina (E) se observó en ambos la formación de un tejido conectivo denso que conecta los bordes de los defectos. En el grupo experimental con CEMP1-p3 se muestra la completa formación ósea por medio de islas de hueso (F).

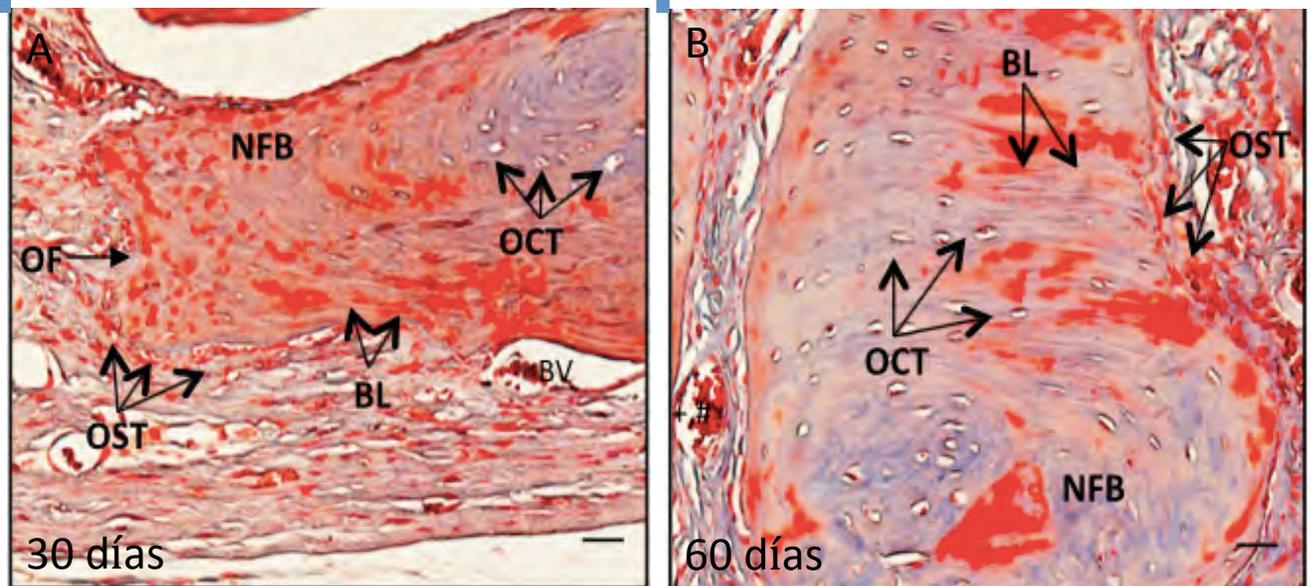


Figura 23. Microfotografía 400 X, escala 50 μ m. Las flechas indican los bordes del defecto (A, B). Día 30 (A) y 60 (B), ambas imágenes representan las muestras tratadas con andamio y péptido, muestran islas de tejido óseo limitado por tejido conectivo fibroso denso; con presencia de osteocitos, osteoblastos y hueso lamelar bien organizado. En el día 30, se observa la formación osteoide osteoblastos (OST), osteocitos (OCT), nueva formación de hueso (NFB), Osteoide frontal (OF), hueso lamelar (BL).

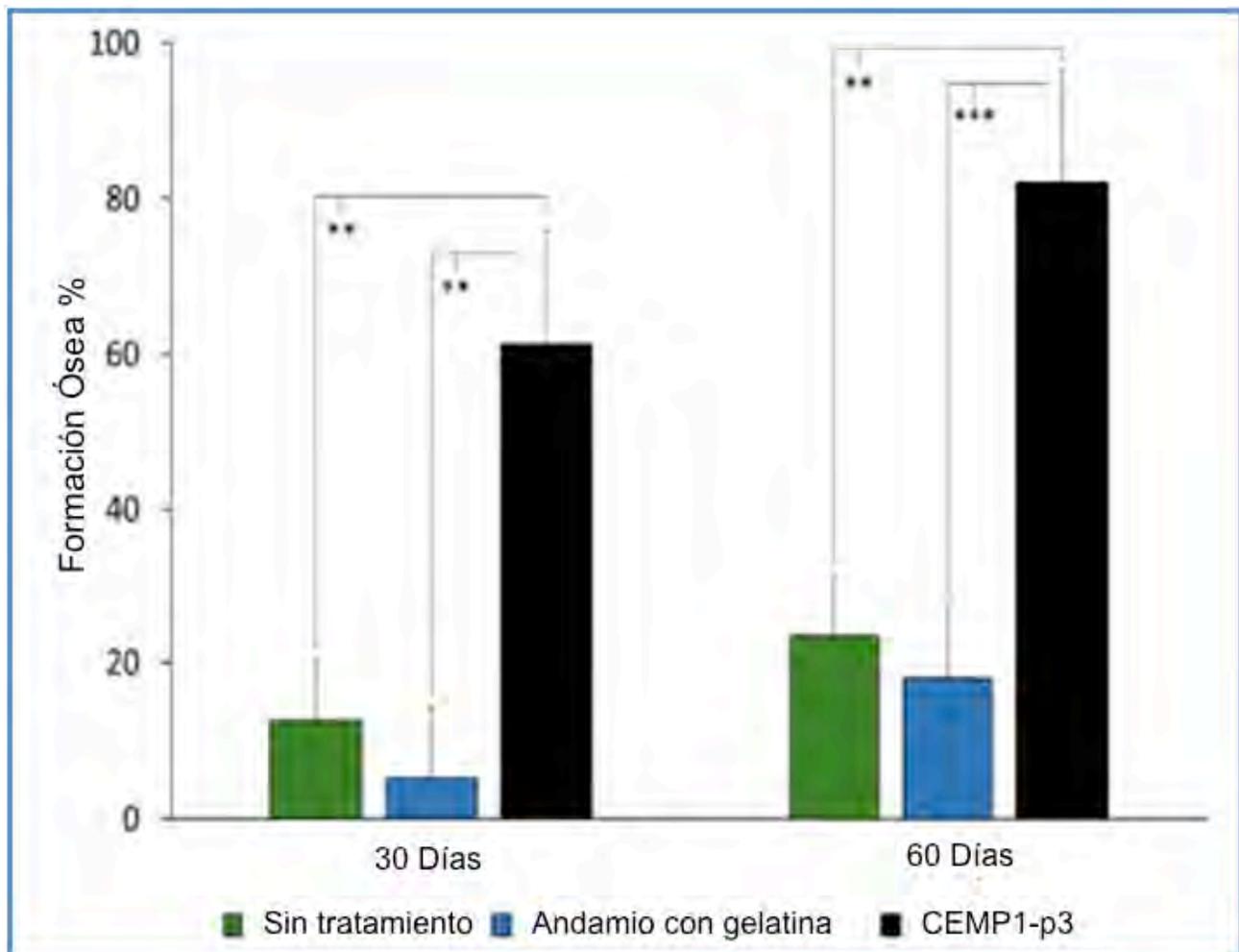


Figura 24. Análisis de los defectos en calvarias de rata tratadas con CEMP1-p3. Las gráficas muestran que después del día 30 y 60, los defectos presentan un 61.29 ± 1.1 y 81.96 ± 0.99 % de hueso nuevo respectivamente, las calvarias sin gelatina (12.62 ± 0.42 y 23.43 ± 1.39 %, y las tratadas con una esponja de gelatina reabsorbible 5.16 ± 1.13 y 18.08 ± 0.74 %. **P ,0.01, *P , 0.001.**

La expresión de marcadores moleculares *in vivo* en las calvarias de rata tratadas con el péptido CEMP1-p3, fue determinada mediante cortes histológicos en el día 60 posterior a la cirugía por doble marcaje con inmunofluorescencia. Los resultados indican que IBSP es fuertemente expresado por pre osteoblastos, osteoblastos en los extremos del hueso, osteocitos y células estromales localizadas en el tejido conectivo que rodea la periferia del hueso. (Fig. 25 A,E,I,M). Nuestros resultados indican la presencia de células preosteoblásticas y osteoblásticas localizadas en los bordes del hueso recién formado. OSX

y RUNX son expresadas por osteocitos (Fig. 25 B,F), mientras que BMP2 mostró su expresión en osteoblastos que recubren el frente mineralizado del tejido óseo y en algunas células estromales (Fig. 25. J). La OCN es un marcador osteoblástico y fue expresado por osteoblastos y algunas células estromales (Fig 25 N). IBSP fue localizada junto a OSX y RUNX2 en pre osteoblastos, osteoblastos, osteocitos y células estromales promoviendo la nueva formación de hueso (Fig. 25 C,G,K), sin embargo OCN presentó una debil expresión osteoblastos y células estromales (Fig. 25 C,G,K,O). Nuestros datos demuestran que el péptido de CEMP1, induce la diferenciación de células representativas de linaje osteoblástico y emulan las características moleculares de la nueva formación ósea. Los controles resultaron negativos (Fig. 25 Q,R,S). La tinción Tricrómica de Masson nos permitió tener una buena orientación anatómica (Fig. 25 D,H,L,P,T). Los defectos con andamio y sin andamio no expresaron marcadores moleculares relacionados a la formación ósea ya que los defectos fueron llenados por tejido conectivo fibroso (Fig. 25 S).

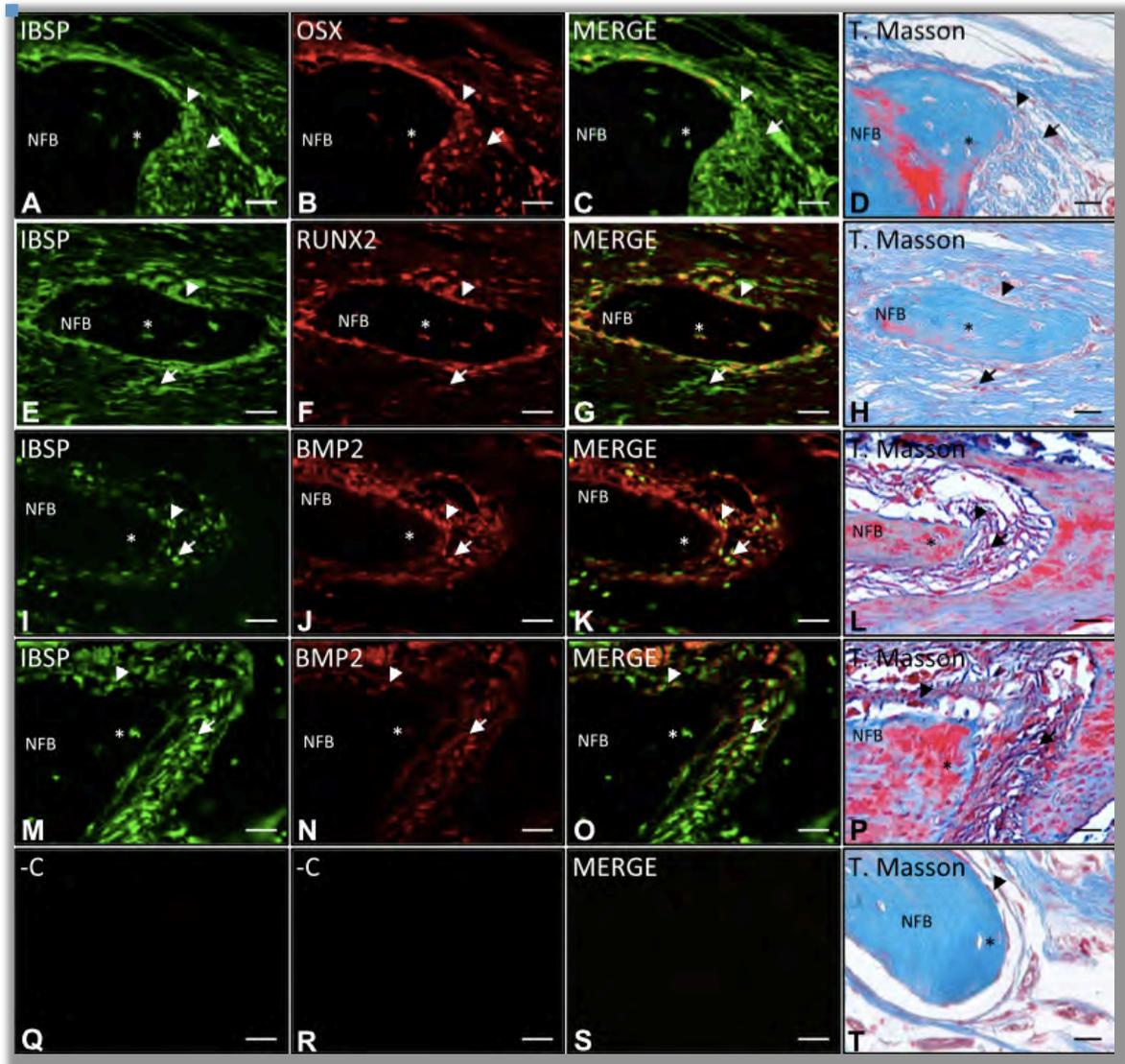


Figura 25. Doble tinción y co-localización de marcadores moleculares relacionados con hueso (IBSP, BMP2, RUNX2, OSX y OCN) sobre defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas tratadas con el péptido de CEMP1.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio obtenidos a través de diversas técnicas de caracterización físico-química por técnicas de microscopía y espectroscopía indican que CEMP1-p3 es una molécula cuya conformación es determinante ante diversos factores como pH, soluciones, amortiguadores y temperatura. El análisis *in silico* ha demostrado la presencia de grupos funcionales en los aminoácidos que constituyen la secuencia del péptido CEMP1-p3, ya que se sabe que los aminoácidos, son los constructores de bloques que conforman las proteínas y los cuales tienen un importante papel fisiológico en las diversas formas de vida. Los aminoácidos pueden utilizarse como modelo para identificar la importancia de estos como conectores moleculares en diversos procesos ¹³⁰, como en la cristalización de la hidroxiapatita, regulando el proceso de nucleación, crecimiento y direccionamiento de cristales.

Se sabe que la interacción de la HAp con macromoléculas biológicas, péptidos o aminoácidos es un mecanismo prometedor para el desarrollo de moléculas capaces de controlar la carga superficial de HAp. En la naturaleza, cada aminoácido posee diferentes puntos isoeléctricos relacionados con los grupos carboxilo (-COOH) y amino (-NH₂) de los diversos aminoácidos. La inmovilización de diferentes aminoácidos en la superficie de HA podría ser una forma efectiva en la regulación de su polaridad superficial y esta diferencia en grados de polaridad superficial podrían regular la adsorción de proteínas polares (básicas o ácidas) en los sitios específicos de unión a HAp ¹³¹.

Algunos aminoácidos han sido relevantes durante diferentes métodos de síntesis de HAp como es el ácido glutámico durante el método hidrotermal asistido por microondas, el cual demostró la formación de nano estructuras cristalinas, guiando su crecimiento y dirigiendo la disposición de pequeñas estructuras que eran dependientes de la concentración de ácido glutámico, permitiendo la orientación cristalina perpendicular al plano (001) en forma de cristales hexagonales ¹³².

Existen reportes que indican que los grupos carboxilo terminales de aminoácidos como L-

aspártico, L- glutámico y L- arginina se unen a los iones de calcio en la superficie adsorbente de la HAp. Los mecanismos de adsorción de proteínas en las superficies de la HAp se basa en tres factores:

1. Propiedades inherentes de la superficie de los materiales ¹³³, como el grado de cristalinidad, área superficial, energía superficial e hidrofobicidad ¹³⁴.
2. Condiciones fisiológicas, incluida la fuerza iónica ¹³⁵, pH de la solución de trabajo ¹³⁶.
3. Interacciones proteína-material, como la unión específica de Ca^{2+} y sitios PO_4^{3-} ¹³⁷, uniones no específicas por medio de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas.

Los mecanismos de adsorción con la HAp son iniciados con la formación de una capa de aniones como $\text{H}_2\text{PO}_4^{3-}$ además de OH^- , seguida por la doble capa eléctrica dispersa alrededor de la superficie ¹³⁸. Las moléculas son adsorbidas a través de interacciones entre grupos con alguna carga, su relación entre enlaces de hidrógeno con superficies polares vecinas ¹³⁹ y adsorción del grupo carboxilo de proteínas ácidas como la BSA hacia el Ca^{2+} , a través del desplazamiento de PO_4^{3-} . Al entrar en contacto con la superficie de la HAp, la conformación de la BSA podría cambiar por exposición de NH_3^+ formando enlaces de hidrógeno con el grupo fosfato de la HAp ¹⁴⁰⁻¹⁴¹. Dentro de la secuencia del péptido de CEMP1, observamos la presencia de un grupo imidazol en la histidina que podría actuar como donador de electrones hacia la superficie de la hidroxiapatita ante un pH fisiológico, así mismo los grupos carbonilo presentes en la glutamina, glicina, prolina y lisina otorgando la característica hidrofílica, así como grupos metilo en la isoleucina, Alanina, y Valina lo que podrían adquirirle predisposición hidrofóbica para la formación de oligómeros y clústers internos que funcionaran como atrayentes de iones.

Previamente ha sido reportada la utilidad de análisis por DLS para determinar el comportamiento de nano partículas durante el proceso de nucleación y crecimiento. Es una técnica fácil y relativamente rápida, la cual nos permite monitorear en una etapa inicial la precipitación, tamaño de las partículas, concentración, presencia de grupos fosfato ¹⁴², precipitación de carbonatos de calcio ¹⁴³ y la nucleación y crecimiento de cristales de fosfato de calcio en presencia de OPN nativa de tejido óseo de rata, OPN recombinante y una OPN recombinante con fosforilaciones ¹⁴⁴.

En nuestro estudio observamos que el péptido es estable conforme la temperatura se va elevando. A 32 °C se muestran poblaciones polidispersas, las moléculas presentan tamaños aproximados a 1-10, 100 y 1000 nm, mientras a una temperatura de 37 °C se formaron unidades monodispersas con tamaños aproximados de 200 a 400 nm. El movimiento browniano de las moléculas se incrementan conforme la temperatura aumenta, esto provoca oligomerización del péptido posiblemente por la interacción electrostática, interacciones hidrofílicas entre moléculas y algunas hidrofóbicas que promueven la formación de clústers para el inicio de una nucleación, estas unidades se van agregando en monómeros de forma ordenada y ensamblando las partículas en estructuras laminares que darán origen a las esférulas. La cargas electrostáticas de CEMP1-p3 son positivas por lo que podrían estar atrayendo iones negativos PO_4^{3-} , este fenómeno de auto ensamblaje es similar al observado en la Amelogenina ¹⁴⁵. El tamaño de las moléculas de CEMP1-p3 es aproximado a los de la proteína hrCEMP1 cuando le es adicionada una concentración de cloruro de calcio en solución (2mM CaCl_2), presentando el 100 % de las moléculas un diámetro de 241nm ^{68,116}.

La presencia de esta oligomerización es de importancia ya que a partir de este mecanismo, se da inicio a un proceso que se define como nucleación. La nucleación es el proceso por el cual una fase sólida se segrega a la solución para formar agregados cristalinos termodinámicamente estables. Por un lado cuando la formación de gérmenes ocurre en el seno de una solución libre de partículas y superficies extrañas denominada nucleación homogénea, mientras que cuando existe presencia de partículas extrañas puede provocar la aparición de los núcleos a unos valores de sobresaturación inferiores a los requeridos para que se produzca la nucleación heterogénea. Este último mecanismo cobra importancia en este estudio debido a que es un proceso que involucra la formación de fosfatos de calcio en diversos tejidos mineralizados, sin embargo el mecanismo a través del cual este sistema funciona, no está bien entendido. La nucleación heterogénea es de gran importancia en la biomineralización de hueso, dientes y conchas de moluscos; en nuestro estudio es un fenómeno que se produce por las diversas interacciones, dinámica y cinética que producen las diversas partículas incluidas, como los iones Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Na, Cl y la presencia del péptido en el sistema, los cuales tienen la capacidad de interaccionar sí.

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, siguiendo una serie de pasos a través de una curva de solubilidad y metaestabilidad, 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 (¹²⁰⁻¹²²).

Por las características detalladas en el análisis *in silico* del péptido y sus aminoácidos, pensamos que el carácter hidrofílico del péptido podría estar involucrado en la adsorción hacia la superficie de la HAp, interactuando directamente con su superficie, este mecanismo es demostrado con la Amelogenina a través de su dominio en el carboxilo terminal ya que contiene dos residuos de ácido glutámico y dos residuos de ácido aspártico; aminoácidos ácidos involucrados en la biomineralización de hueso (¹¹⁶⁻¹¹⁸) y carbonatos de calcio en moluscos promoviendo la unión al calcio ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

Desde 1965 Posner et. al. ya habían propuesto que los fosfatos de calcio amorfos era la primer fase sólida formada durante la precipitación de fosfatos de calcio cuando se utilizaban condiciones parecidas a las fisiológicas ^{67,149}. También propuso que la unidad estructural básica de estos fosfato es $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ denominado clúster de Posner ¹⁵⁰. Actualmente puede considerarse los fosfatos de calcio amorfos como un proceso de agregación ^{151,152,153} en el cual un gran número de clústers, agregados en partículas de forma esférica, con un diámetro que va de 30 a 100 nm forman una serie de cadenas, los cuales dependientes de las concentraciones fisiológicas y experimentales pueden formar fases minerales estables como la HAp, fosfato octacálcico, fosfatos de calcio hidratados y apatita deficiente de calcio ¹⁵⁴⁻¹⁵⁹, los cristales de fosfato de calcio en nuestra investigación están sujetos a diferentes fases de mineralización debido a diversos parámetros termodinámicos y cinéticos que están relacionados con la velocidad de difusión en el sistema y los cuales permiten que los cristales inicien su crecimiento a partir de un punto de nucleación. El sistema de contradifusión comienza cuando las concentraciones de soluto son más altas que los niveles de equilibrio en el sistema, este fenómeno es conocido como supersaturación. En otras palabras, la concentración del péptido será dependiente de los iones calcio y fosfato por medio de un pH y temperatura, los cuales se moverán en una curva de metaestabilidad hasta la formación de un núcleo primario.

En la zona del núcleo de las esférulas se encontraron depósitos de NaCl, y una fase mineral que correspondía a fosfato de calcio dihidratado, la morfología era irregular en la cual se observaron depósitos de NaCl, la razón que la fase mineral sea menor, se debe a que hay reportes que indican que existen impurezas en la solución que podrían estar involucrados en el proceso de nucleación heterogénea de los cristales, estos resultados son similares a los observados en experimentos realizados con fibrinógeno y albúmina en solución, en donde se observó la presencia de cristales los cuales estaban constituidos por capas que presentaban diferente composición mineral principalmente OCP e HAp carbonatada separadas por una capa amorfa. Las microesferas están compuestas por diversas zonas de maduración adquiriendo la naturaleza de un policristal. Están constituidas por láminas bien orientadas, definidas y sus terminaciones en forma de “escamas” o “acículos” dispuestas en ángulos bien definidos. Estas láminas están conformadas por delgadas capas, que siguen un mismo eje de crecimiento, y las cuales están agrupadas por pequeños nano prismas. Estos patrones de crecimiento se deben a que la formación de HAp y OCP es lenta, ya que incluso se puede observar mayor cantidad de alguna de estas dos fases, debido a que alguna presenta un incremento en la cinética y disminución de la fuerza termodinámica, por lo que ambos factores son importantes para que tengan equilibrio durante la formación de estos cristales (Fig. 26).

La morfología y fases de mineralización de estos cristales están relacionados con el experimento realizado por Füredi-Milhofer et al. En el cual mostraron la influencia de polielectrolitos, sulfonato de poliestireno, poli L Lisina y el ácido poli L glutámico en la formación y propiedades de los fosfatos de calcio así como en la morfología de nucleación y crecimiento de diversas fases cristalinas. Se comprobó que existen tres diferentes tiempos:

1. Precipitación de fosfato de calcio amorfo.
2. Precipitación secundaria de una fase cristalina sobre el precursor amorfo.
3. Transformación de una fase dependiente de la solución con una relación Ca/P 1.39, correspondiendo a fosfato octacálcico y pequeñas cantidades de apatita.¹⁶⁰

En un experimento realizado con Amelogenina, se observó que al utilizar condiciones de supersaturación promovieron la formación de núcleos que eventualmente maduraron en estructuras cristalinas menos orientadas y definidos debido a un desajuste en la estructura

interplanar ¹⁶¹.

En la actualidad sabemos que dependiendo de la orientación de crecimiento o inhibición de un péptido, proteína o molécula, dará como resultado cambios morfológicos sobre la estructura de cristales; obteniendo diversas morfologías cristalinas, en forma de esfera, varilla, fibras, placas, escamas; las cuales ya han sido ampliamente estudiadas en el área de biomineralización y bioingeniería de tejidos intentando desarrollar nuevos fármacos o sustitutos óseos que puedan dirigir un habito de crecimiento cristalino ¹³².

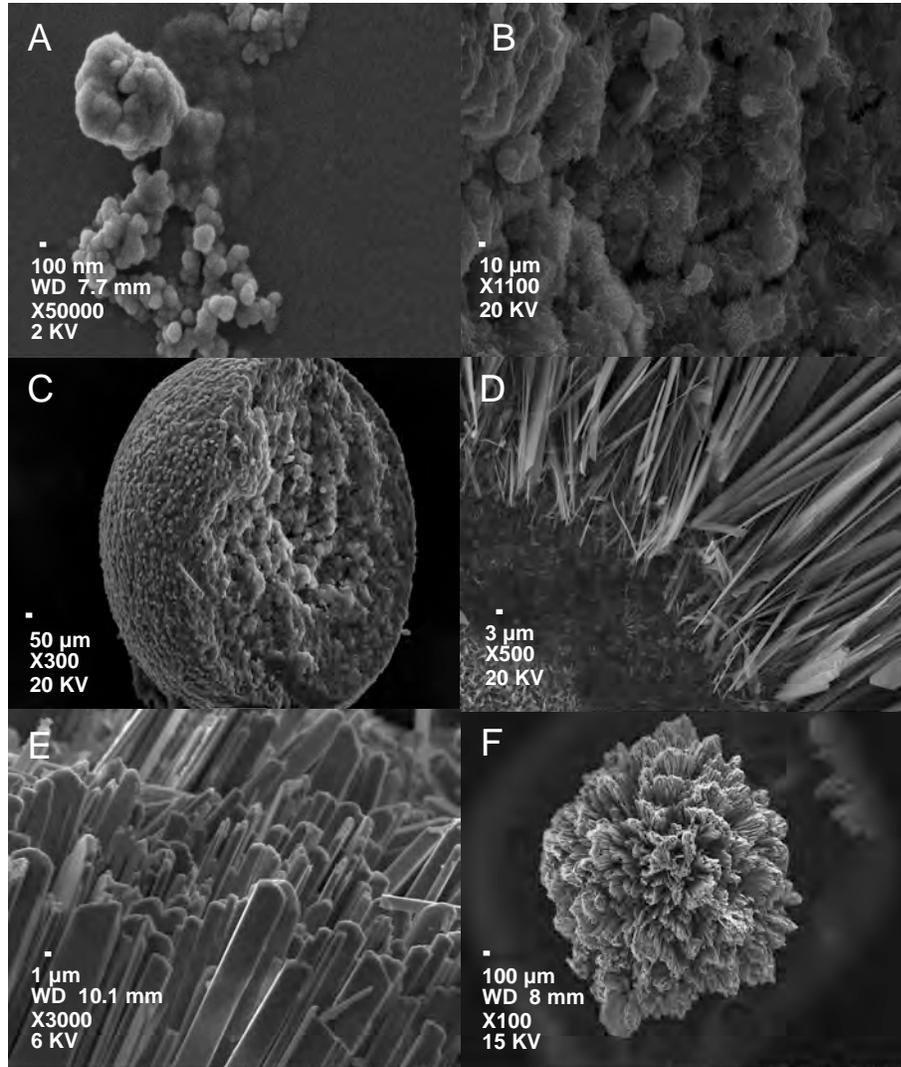


Figura 26. Etapas de maduración de los cristales de fosfato de calcio que promueve el péptido de CEMP1-p3 en (A) observamos la formación de subunidades oligoméricas las cuales se auto ensamblan por interacciones electrostáticas con iones PO_4^{3-} y afinidad de aminoácidos hacia el Ca^{+2} y elementos traza como NaCl hasta la formación de clústers (B) que eventualmente formaran un núcleo primario (C) del cual emergerán cristales en forma de agujas delgadas (D) los cuales sufrirán un proceso de maduración y crecerán hacia una dirección y orientación cristalina (E) hasta la formación de micro esferas (F).

La importancia del pH en el crecimiento y maduración de cristales se refleja en las propiedades que presentan las soluciones debido a diversos equilibrios mono y polipróticos, esto provoca una alteración en la concentración de protonación y esto será reflejado en la composición de calcio y fosfato. Se ha demostrado el control morfológico de partículas de HAp ajustando el pH y adicionando pequeñas cantidades de gelatina y urea; mostraron la formación de precursores de HAp como: ACP OCP e HAp, induciendo variaciones morfológicas así como una transformación de fase de OCP a HAp ¹⁶².

Como sabemos la HAp ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es biológicamente importante ya que es el principal mineral que constituye los huesos y el esmalte dental de mamíferos, en el esmalte humano constituye casi 96 % y el otro 4 % corresponde a material orgánico. La HAp comúnmente es encontrada de forma hexagonal con una simetría espacial de $P6_3/m$ y sus parámetros de celda son $a= 0.943$ nm, $c= 0.688$ nm y $\gamma= 120^\circ$ ¹³⁶ sin embargo para la formación y maduración de este mineral existen fases previas que le otorgan características únicas para llegar a este paso de maduración es necesario contar con ciertas condiciones relevantes como es la temperatura, pH, concentración de iones y presencia y ausencia de macromoléculas.

El fosfato octacálcico (OCP, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) es un mineral, que ha sido encontrado en cálculos renales, tejido dental y hueso por Brown et al. Funciona como precursor de la HAp; es termodinámicamente y estructuralmente similar a esta. Presenta una estructura triclinica y una simetría P1, $a= 19.87$, $b= 9.63$, $c= 6.87$ Å, $\alpha= 90.13$, $\beta= 92.13$, $\gamma= 108.36^\circ$ ¹⁶³. Este mineral es importante como precursor de biomateriales de fosfato de calcio y hay reportes de que participa para el crecimiento de cristales ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Por lo general son cristales color blanco con un tamaño aproximado de 800 μm . Su morfología corresponde a largas caras basales en el plano (010) y son cristales elongados en el eje c y terminando en el plano (101), la morfología es en forma de placas las cuales emergen de un núcleo de crecimiento ¹⁶⁷.

Por medio de HRTEM y FFT, obtuvimos los valores de 0.264 y 0.347 nm correspondiente a las distancias interplanares (101) y (001) de la HAp. El plano (001) presenta mayor intensidad, por lo que sugerimos que este plano es correspondiente al eje c de la HAp. Estos datos son comparados con los obtenidos por difracción de rayos x, el cual indica la presencia de dos fases cristalinas que corresponden a NaCl, y reflexiones que corresponden a OCP con una mayor intensidad en los planos (010), y (1-10), además de una reflexión muy intensa en el plano (002), lo que corrobora la presencia de HAp en los cristales.

Nuestros resultados mostraron en una concentración de 5 µg/ml el péptido CEMP1-p3, estimula la proliferación de HuPLCs, por lo que esta secuencia podría estar funcionando como un factor de crecimiento. Otros análisis revelaron que el péptido de CEMP1 promueve el incremento en la actividad de fosfatasa alcalina específica y la formación de nodulos mineralizados en los cultivos de HuPLCs. Se entiende que la función de ALP es la hidrólisis de pirofosfato inorgánico, este es un potente inhibidor en la formación de Hidroxiapatita ¹⁶⁸, sin embargo si existe un cambio en los niveles de fosfatasa alcalina específica tiene un efecto considerable sobre la función osteoblástica y como consecuencia en la mineralización de la matriz ¹⁶⁹. Estos datos sugieren que el péptido CEMP1-p3 promueve la diferenciación de HuPLCs hacia un fenotipo mineralizado, este resultado fue determinante al realizar el análisis molecular por qRT-PCR. El péptido induce la expresión de ARN mensajero de marcadores moleculares relacionados con la formación ósea, como IBSP, OCN, OSX, RUNX2, BMP2 y CEMP1.

La expresión de BMP2, la cual es un miembro de la familia TGF β , promueve la diferenciación y maduración osteoblástica, acelerando la reparación de los defectos óseos ^{170,171}, incrementando hasta 5 veces en un tiempo de 10 días y 3 veces en 15 días comparado con los grupos controles. RUNX2, es un factor de transcripción específico que induce la diferenciación de células osteorprogenitoras a osteoblastos, regulando su maduración ¹⁷¹. También OSX, es un factor de transcripción con un importante papel al inicio de la regulación de formación y reconstrucción ósea ¹⁷², este factor demostró incrementar su expresión hasta 3 veces más en un tiempo de 10 días comparado con el grupo control. La OCN es un indicador biológico utilizado para calcular la formación ósea durante etapas tardías de diferenciación, teniendo gran afinidad sobre el Ca²⁺ e HAp a

través de la interacción con el dominio residual Gla; participa también en la regulación de la mineralización de la matriz ósea ^{173,174}. Nuestros resultados indican que el ARN mensajero de OCN, está incrementado hasta 15-25 veces más en HuPLCs tratadas con el péptido comparado con los controles. Ya ha sido reportado que hrCEMP1 promueve la diferenciación de HuPLCs hacia un fenotipo mineralizante. El péptido CEMP1-p3 induce la expresión de CEMP1 hasta 25 veces en un tiempo de 10 días sobre HuPLCs, por lo que podría indicar un efecto paracrino del péptido.

Nuestros resultados indican que la expresión de RUNX2 y OSX están asociados con el nivel de expresión de CEMP1, estos datos indican que CEMP1 podría tener un importante papel en la diferenciación de células osteoprogenitoras hacia osteoblastos.

Los estudios *in vivo* demostraron la capacidad del péptido CEMP1-p3 para la completa regeneración del defecto de tamaño crítico en el modelo animal, estos hallazgos son impactantes ya que se sabe que de forma natural estos defectos se podrían regenerar únicamente un <10 % del tamaño del defecto durante toda la vida del animal. El análisis histomorfométrico indica que promueve la neo formación ósea 61 ± 2.4 y 82 ± 2.97 % a los 30 y 60 días respectivamente comparado con el grupo sin andamio y con andamio de gelatina sin péptido. Ya ha sido reportado que hrCEMP-1 promueve la regeneración ósea en un 97 % del defecto, sin embargo estos resultados fueron observados a los 120 días posteriores a la cirugía. También ha sido reportada la importancia en la expresión de genes como RUNX2, OSX, BMP2, OCN y IBSP, durante la diferenciación de células humanas del ligamento periodontal (HuPLCs) hacia un fenotipo mineralizante⁽⁹⁰⁾, ya que el papel de expresión de RUNX2 y OSX tienen relevancia en la osteogénesis y son considerados factores osteogénicos al inducir el cambio y diferenciación de células osteoprogenitoras a un linaje osteoblástico con la expresión de BMP2, OCN y IBSP, los cuales participan en la formación de matriz ósea madura ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

CONCLUSIONES

La caracterización del péptido CEMP1-p3 ha permitido demostrar que es una molécula de carácter hidrofílico, pI 8.1 y un peso teórico de 1.98 kDa, la cual su estudio *in silico*, mostró una estructura secundaria en forma de doble hélice y zonas aleatorias, los 20 aminoácidos que constituyen la secuencia, le otorgan características relevantes reflejadas en los análisis por μ Raman, como la formación de estructura aleatoria y alfa hélice, presencia de grupos metilo, anillo de la histidina como donadora de electrones y presencia de puentes disulfuro.

Este péptido se presenta en subunidades oligoméricas de 200 a 400 nm que eventualmente forman clústers por nucleación heterogénea donde a partir de un núcleo emergen estructuras laminares y auto ensambladas con tamaños aproximados de 1 a 3 μ m en forma de aguja y escamas, las cuales son dirigidas hacia un mismo eje de crecimiento formando esférulas bien organizadas de origen policristalino, demostrando la importancia de condiciones constantes para su organización como un pH de 7.2 y 37 °C en un tiempo de 7 días bajo una concentración ideal de 100 μ g. Los datos por HRTEM y Difracción de Rayos X demostraron un habito de crecimiento sobre la cara (010) y (002) correspondientes al eje C del OCP y un posible cambio de fase a HAp por los datos obtenidos por HRTEM y EDS.

Se demostró que CEMP1-p3, es una molécula que participa en el proceso de nucleación de cristales de fosfato de calcio, promueve la diferenciación de HuPLCs hacia un fenotipo mineralizante con la expresión de marcadores moleculares importantes que participan en la formación de hueso como IBSP, OCN, OSX, RUNX2, BMP2 y CEMP1 y el incremento de la actividad de Fosfatasa Alcalina Específica. Demostró ser un péptido bioactivo con la capacidad de promover la formación total y maduración de hueso nuevo en un periodo de 30 y 60 días, por lo que se le atribuye la participación en el proceso de mineralización y osteogénesis *in vivo* emulando y mejorando las características físico químicas de la proteína recombinante hrCEMP1.

El péptido CEMP1-p3, es una nueva biomolécula la cual podría ser candidata como agente osteoinductivo para el tratamiento de desordenes y defectos óseos además de un importante papel en la regeneración ósea.

BIBLIOGRAFÍA

1. P. Mark Bartold, Christopher A. McCulloch. Information generation and processing systems that regulate periodontal structure and function. *Periodontology* 2000, Vol. 63, 2013, 7–13.
2. Academy Report, Periodontal Regeneration. *J. Periodontol.* Sep 2005. Volume 76, Number 9; 1601-1622.
3. Arzate, H., Zeichner-David, M., and Mercado-Celis, G. (2015) Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol.* 2000 67, 211–233.
4. Tavafoghi M, and Cerruti M. (2016). The role of amino acids in hydroxiapatite mineralization. *J.R. Soc. Interface* 13, 20160462.
5. Cho M, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol* 2000 Oct; 24:9-27.
6. Goldstein M, Brayer L, Schwartz Z. A critical evaluation of methods for roots coverage. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996: 7: 87-88.
7. Al- Hamdan K, Eber R, Sarment D, Kowalski C, Wang HL. Guided tissue regeneration-based root coverage: meta –analysis. *J Periodontol* 2003: 74: 1520-1533.
8. Miller PD, Caddock RD. Surgical advances in the coverage of exposed roots. *Curr Opin Periodontol* 1996: 3: 103-108.
9. Murphy KJ, Gunsolley JC. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003: 8: 266-302.
10. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003: 8: 227-265.
11. Froum SJ, Gomez C, Breault MR. Current concepts of periodontal regeneration. A review of the literature. *N Y State Dent* 2002: 68: 14–22.
12. Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002: 13: 474–484.
13. King GN. New regenerative technologies: rationale and potential for periodontal regeneration: 1. New advances in established regenerative strategies. *Dent Update* 2001: 28: 7–12.
14. Kuboki Y, Sasaki M, Saito A, Takita H, Kato H. Regeneration of periodontal ligament and cementum by BMP-applied tissue engineering. *Eur J Oral Sci* 1998: 106: 197–203.

15. King GN, Cochran DL. Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal Cementum proteins 229 regeneration: a critical review. *J Periodontol* 2002; 73: 925–936.
16. Lamster IB. Current concepts and future trends for periodontal disease and periodontal therapy, Part 2: classification, diagnosis, and nonsurgical and surgical therapy. *Dent Today* 2001; 20: 86–91.
17. McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol* 2002; 73: 1377–1391.
18. Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 1025–1032.
19. Oringer RJ. Biological mediators for periodontal and bone regeneration. *Compend Contin Educ Dent* 2002; 23: 501– 514.
20. Tozum TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc* 2003; 69: 664.
21. Wikesjo UM, Sorensen RG, Kinoshita A, Jian Li X, Wozney JM. Periodontal repair in dogs: effect of recombinant human bone morphogenetic protein-12 (rhBMP-12) on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 662–670.
22. Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontol* 2000 2006; 41: 196– 217.
23. Cho MI, Lin WL, Genco RJ. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol* 1995; 66: 522–530.
24. Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol* 1994; 65: 1158–1168.
25. Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1997; 68: 1186–1193.
26. Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniades HN. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1991; 62: 458–467.

27. Park JB, Matsuura M, Han KY, Norderyd O, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J Periodontol* 1995; 66: 462–477.
28. Rutherford RB, Ryan ME, Kennedy JE, Tucker MM, Charette MF. Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 537–544.
29. Wang HL, Pappert TD, Castelli WA, Chiego DJ Jr, Shyr Y, Smith BA. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. *J Periodontol* 1994; 65: 429–436.
30. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 1992; 63: 515–525.
31. Rutherford RB, Ryan ME, Kennedy JE, Tucker MM, Charette MF. Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 537–544.
32. King GN, King N, Hughes FJ. The effect of root surface demineralization on bone morphogenetic protein-2-induced healing of rat periodontal fenestration defects. *J Periodontol* 1998; 69: 561–570.
33. Kuboki Y, Sasaki M, Saito A, Takita H, Kato H. Regeneration of periodontal ligament and cementum by BMP-applied tissue engineering. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 197–203.
34. Oda S, Kinoshita A, Higuchi T, Shizuya T, Ishikawa I. Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Med Dent Sci* 1997; 44: 53–62.
35. Ripamonti U, Reddi AH. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. *J Periodontal Res* 1994; 29: 225–235.
36. Ripamonti U, Heliotis M, Rueger DC, Sampath TK. Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic protein-1 (hop-1/bmp-7) in the baboon (*Papio ursinus*). *Arch Oral Biol* 1996; 41: 121–126. Cementum proteins 231.
37. Ripamonti U. Soluble osteogenic molecular signals and the induction of bone formation. *Biomaterials* 2006; 27: 807–822.
38. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol* 2000 1997; 13: 20–40.
39. Nudelman F, Chen H.H, Goldberg, H.A, Weiner S, and Addabi L. (2007). Spiers Memorial Lecture. Lessons from Biomineralization: comparing the growth strategies of

- mollusk shell prismatic and nacreous layers in *Atrina rigida*. *Faraday Discuss.* 136, 9-25; discussion 107-123.
40. S. Titsinides, G. Agrogiannis, T. Karatzas Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. *Japanese Dental Science Review* 55(1) September 2018.
 41. Tavafoghi M, and Cerruti M. (2016). The role of amino acids in hydroxiapatite mineralization. *J.R. Soc. Interface* 13, 20160462.
 42. Cho M, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol* 2000 Oct; 24:9-27.
 43. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol* 2000 1997: 13: 41– 75.
 44. Hammarstrom L, Alati I, Fong CD. Origins of cementum. *Oral Dis* 1996: 2: 63–69.
 45. Harrison JW, Roda RS. Intermediate cementum. Development, structure, composition, and potential functions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995: 79: 624–633.
 46. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol* 2000 2000: 24: 73– 98.
 47. Schroeder HE. Biological problems of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. *Int Rev Cytol* 1992: 142: 1–59.
 48. Thomas HF. Root formation. *Int J Dev Biol* 1995: 39: 231- 237.
 49. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology* 2000, 2003; 24: 73-98. Bartold PM and Narayanan AS. *Biology of the periodontal connective tissue*. Quintessence Publishing CO, Inc. 1998 Carol Stream, Illinois, USA.
 50. Bonucci E. *Calcification in biological systems*. Florida Estados Unidos. CRC press 1992.
 51. Selvig KA. The fine structure of human cementum. *Acta Odontol Scand* 1965; 23: 423-41.
 52. Nakagaki H, Weatherell JA, Strong M, Robinson C. Distribution of fluoride in human cementum. *Arch Oral Biol* 1985; 30: 101-4.
 53. Goncalves, P.F., Sallum, E.A., Sallum, A.W., Casati, M.Z., Toledo, S.P., & Junior, F.H. (2005). Dental cementum reviewed : development , structure , composition , regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci*, 2005. Vol. 4: 12.
 54. Glimcher MJ. Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat Rec* 1989: 224: 139–153.

55. Vidal BC, Mello MLS, Valdrighi L. Histochemical and an- isotropical aspects of the rat cementum. *Acta Anat* 1974; 89: 546–559.
56. Scott JE. Collagen-proteoglycan interactions. Localization of proteoglycans in tendon by electromicroscopy. *Biochem J* 1980; 187: 887–891.
57. Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small pro- teoglycan of tendon. *Biochem J* 1985; 223: 587–597.
58. Alvarez M, Narayanan AS, Zeichner-David M, Carmona B, Arzate H (2006) Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* 38: 409–419.
59. Carmona-Rodríguez B, Alvarez-Pe´rez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, et al. (2007) Human Cementum Protein 1 induces expression of one and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 358: 763–769.
60. Carlin B, JeffeR, Bender. B, Chung AE. Entactin, anovel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J BioChem* 1981; 256:5209.
61. Desbois C, Karsently G. Osteocalcin cluster: implications for functional studies. *J Cell Biochem* 1995; 57: 379.
62. Malathi K, Jenapriya R, Aadhirai M, Hemalatha J. Role of noncollagenous proteins in periodontal tissue. *Jident Issue 3 Vol 2*; 2017.
63. Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* 1982; 95: 369-77.
64. Furtado P, Sallum E, Sallum A, Zaffalon M, Toledo S, Nociti F. Dental Cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci.* 2005. Vol 4, 12.
65. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.* 1993;7:1475–82.
66. Shankar V, Parthiban, Sydhakar U, Mithradas N, Prabhakar R. Bonemarkers in Periodontal Disease: A Review Article. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2015. Vol 9 (1): 7-10.
67. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissue in health and disease. *Periodontology* 2000. 2006; 40: 11-28.
68. Romo E. (2014). CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEINA DEL CEMENTO 1 (CEMP 1) Y SU RELACIÓN CON LA FUNCTION BIOLÓGICA (testis doctorado) Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
69. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy of diseased periodontal tissues. *Periodontology* 2000. 2006; 40: 29-49.

70. Ivanovski S, Komaki M, Bartold PM, Narayanan AS. Periodontal-derived cells attach to cementum attachment protein via $\alpha 5\beta 1$ integrin. *J Period Res* 1999; 34: 154-159
71. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 2000; 19: 615-22.
72. Gehron P. Cell-mediated calcification *in vitro*. En Bonucci E. Calcification in biological systems. Florida. Estados Unidos CRC press 1992.
73. Cole DE, Hanley DA. Osteocalcin. In: Hall BK, editor. Bone matrix and bone specific products. London, UK: CRC Press, 1991: 239–294 .
74. Kagayama M, Li HC, Zhu J, Sasano Y, Hatakeyama Y, Mizoguchi I. Expression of osteocalcin in cementoblasts forming acellular cementum. *J Periodontal Res* 1997; 32: 273–278.
75. Clemens TL, Karsenty G. The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res*, 2011; 26: 677-80.
76. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*. 2016; 82: 42-49.
77. Van den Boss T, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament: age effect relation to cementum growth rate. *J Period Res* 1999; 34; 1-6.
78. Nian H, Qin LP, Zheng Hc, Yu YH, Huang BK. Antiosteoporotic activity of Er-Xian Decoction, a traditional Chinese herbal formula, in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol*. 2006; 108: 96-102.
79. Negri L. Regulation of bone Mineralization by inorganic and peptide factors. *Rev Arg Endocrinol y Met*. 2011; 48 (4): 216-24.
80. Ureña P, Hruby M, Ferrerira A, ang KS, de Vernejoul MC. Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 1996; 7: 506-512.
81. Groeneveld MC, Evert V, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal gingiva of the rat molar: Its relation to cementum formation. *J Dent Res* 1995; 74: 1374-1381.
82. 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.
83. Arzate H, Jimenez LF, Alvarez M, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human cementoblastoma conditioned medium derived protein. *J Dent Res* 2002; 81: 541–546.
84. Carmona-Rodríguez, B., Alvarez-Peréz, M. A., Narayanan, A. S., Zeichner- David, M., Reyes-Gasga, J., Molina-Guarneros, J., García-Hernández, A. L., Suárez-Franco, J. L., Chavarría, I. G., Villarreal-Ramírez, E., and Arzate, H. (2007) Human cementum protein 1

- induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 763–769.
85. Komaki, M., Iwasaki, K., Arzate, H., Narayanan, A. S., Izumi, Y., and Morita, I. (2012) Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J. Cell. Physiol.* 227, 649–657 .
 86. Hoz, L., Romo, E., Zeichner-David, M., Sanz, M., Nuñez, J., Gaitán, L., Mercado, G., and Arzate, H. (2012). Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol. Int.* 36; 129–136.
 87. Romo-Arévalo E, Arzate H, Montoya-Ayala G, and Rodriguez Romero A, (2016). High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum protein 1 with lectin activity. *FEBS Lett.* 590, 129-138.
 88. Correa R, Arenas J, Gonzalo M, Hoz L, López S, Salgado F, Salmeron N, Romo E, Zeichner-David M, Arzate H. Synthetic cementum protein 1–derived peptide regulates mineralization in vitro and promotes bone regeneration in vivo. 2018. *FASEB journal.* Vol.33; 1-12.
 89. Chen, X., Liu, Y., Yang, J., Wu, W., Miao, L., Yu, Y., Yang, X., and Sun, W. (2016) The synthesis of hydroxyapatite with different crystallinities by controlling the concentration of recombinant CEMP1 for biological application. *Mater. Sci. Eng. C* 59, 384–389
 90. Serrano, J., Romo, E., Bermúdez, M., Narayanan, A. S., Zeichner-David, M., Santos, L., and Arzate, H. (2013) Bone regeneration in rat cranium critical-size defects induced by cementum protein 1 (CEMP1). *PLoS One* 8, e78807.
 91. 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.
 92. Montoya, G., Arenas, J., Romo, E., Zeichner-David, M., Alvarez, M., Narayanan, A. S., Velázquez, U., Mercado, G., and Arzate, H. (2014) Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/ CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. *Bone* 69, 154–164.
 93. Montoya G. (2015). ESTUDIO DE CRISTALES INDUCIDOS CON EL PÉPTIDO DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR (CAP) EN UN SISTEMA LIBRE DE CÉLULAS. (tesis doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
 94. Cortés S. (2016). Péptido derivado de CAP para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo animal. (tesis maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México

95. S. Raja, G Byakod, P. Pudakalkatti. Growth factors in periodontal regeneration. *Int J Dent Hygiene* 7, 2009; 82–89
96. Stuart Jay Forum and Cynthia Gomez. Periodontal regeneration. *Curr Opin Periodontol* 1993; 1: 111–128.
97. Howard T, Howell AA, Gianluca AA, Martuscelli AA, Richard J. Oringer polypeptide growth factors for periodontal regeneration. *Curr Opin Periodontol* 1996; 3: 149–156.
98. Giannobile WV. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *J Periodontal* 1996; 67: 545–553.
99. Lynch SE. The Role of Growth Factors in Periodontal Repair and Regeneration in 'Periodontal Regeneration – Current Status and Directions'. Illinois, Quintessence, 1994.
100. Graves DT, Cochran DL. Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. *Curr Opin Periodontol* 1994; 2: 178–186.
101. Lynch SE, De Castilla GR, Williams RC et al. The effects of short- term application of a combination of platelet-derived and insulin growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1991; 62: 458–467.
102. Rutherford RB, Niekrash CE, Kennedy JE, Charette MF. Platelet- derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodontal Res* 1992; 27: 285–290.
103. Cho Moon OL, Wen-Langhin AA, Genco Robert J. Platelet derived growth factor – modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol* 1995; 66: 522–530.
104. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: bio- chemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993; 165: 728.
105. Werner H, Katz J. The emerging role of insulin like growth factors in oral biology. *J Dent Res* 2004; 83: 832–836.
106. Han X, Amar S. IGF-I signalling enhances cell survival in PDL fibroblasts vs gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003; 82: 454–459.
107. 14 Caffesse RG, Quinones CR. Polypeptide growth factors and attach- ment proteins in

- periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology* 2000 1993; 1: 69–79.
108. Jakob, F., Ebert, R., Ignatius, A., Matsushita, T., Watanabe, Y., Groll, J., and Walles, H. (2013) Bone tissue engineering in osteoporosis. *Maturitas* 75, 118
109. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003; 24:4385–4415.
110. 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.
111. 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.
112. Padovano J.D, Ravindran S, Snee P.T, Ramachandran A, Bedran-Russo AK, George A. DMP1- revides Peptides Promotes Remineralization of Human Dentin.
113. Palmer, L.C.; Newcomb, C.J.; Kaltz, S.R.; Spoerke, E.D.; Stupp, S.I. Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 4754-4783.
114. Yang, X.; Wang, L.; Qin, Y.; Sun, Z.; Henneman, Z.J.; Moradian- Oldak, J.; Nancollas, G.H. How amelogenin orchestrates the organization of hierarchical elongated microstructures of apatite? *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114*, 2293-2300.
115. Fang, P.A.; Conway, J.F.; Margolis, H.C.; Simmer, J.P.; Beniash, E. Hierarchical self-assembly of amelogenin and the regulation of biomineralization at the nanoscale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, *108*, 14097-14102.
116. 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.
117. Wojtas M, Dobryszyccki P, Ozyhar A. Intrinsically Disordered Proteins in Biomineralization. *Advanced Topics in Biomineralization*. 2012.
118. Amos, F.F.; Ponce, C.B. & Evans, J.S. (2011). Formation of framework nacre polypeptide supramolecular assemblies that nucleate polymorphs. *Biomacromolecules*, Vol. 12, No. 5, pp.

1883-1890.

119. Amos, F.F.; Destine, E.; Ponce, C.B. & Evans, J.S. (2010). The N- and C-Terminal Regions of the Pearl-Associated EF Hand Protein, PFMG1, Promote the Formation of the Aragonite Polymorph in Vitro. *Crystal Growth & Design*, Vol. 10, No. 10, pp. 4211-4216
120. Arias, J.L.; Mann, K.; Nys, Y.; Ruiz, J.M.G. & Fernández, M.S. (2007; 2008). *Eggshell Growth and Matrix Macromolecules*, Wiley-VCH Verlag GmbH.
121. Babu, M.M.; van der Lee, R.; de Groot, N.S. & Gsponer, J. (2011). Intrinsically disordered proteins: regulation and disease. *Current Opinion in Structural Biology*, Vol. 21, No. 3, pp. 432-440.
122. Bai, Y.; Chung, J.; Dyson, H.J. & Wright, P.E. (2001). Structural and dynamic characterization of an unfolded state of poplar apo-plastocyanin formed under non-denaturing conditions. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, Vol. 10, No. 5, pp.
123. Bajoghli, B.; Ramialison, M.; Aghaallaei, N.; Czerny, T. & Wittbrodt, J. (2009). Identification of starmaker-like in medaka as a putative target gene of Pax2 in the otic vesicle. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, Vol. 238, No. 11, pp. 2860-2866.
124. Bardet, C.; Vincent, C.; Lajarille, M.C.; Jaffredo, T. & Sire, J.Y. (2010). OC-116, the chicken ortholog of mammalian MEPE found in eggshell, is also expressed in bone cells. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, Vol. 314, No. 8, pp.
125. Bartlett, J.D.; Ganss, B.; Goldberg, M.; Moradian-Oldak, J.; Paine, M.L.; Snead, M.L.; Wen, X.; White, S.N. & Zhou, Y.L. (2006). 3. Protein-protein interactions of the developing enamel matrix. *Current Topics in Developmental Biology*, Vol. 74, pp. 57-115.
126. Villarreal E, Moreno A, Mas-Oliva J, Chavez-Pacheco J.L. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biomineralization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 384(1):49-54.
127. Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5, 725–738.
128. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12, 7–8.

129. Lowry, O.H, Roberts, N.R, Wu, M,-L, Hixon, W.S, and Crawford, E.J. (1954). The quantitative histochemistry of brain, II, enzyme measurements. *J. Biol, Chem.* 207, 19-37.
130. Guangyoun Z, Vian Z, Qi F, Xueliang W. Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecul Spectroscopyç.* 2011; 1187-1195.
131. Lee W, Loo C, Linh K, Zavgorodniy A and Rohanizadeh R. Modulating protein adsorption onto hydroxyapatite particles using different amino acid treatments. *J R Soc Interface.* 2012 ; 9: 70.
132. Rivera E, Velázquez R, Alonso S, Alanís R, Millan B, Bucio L, Huiracge R, Manzano A, Nava R and Apátiga M. HAp Nanofibers Growth with Crystalline Preferential Orientations and Its Influence in Mechanical Propieties of Organic-Inorganic Composite Materials. *Advances in Composite Nanomaterials, Biomedical Applications and Its Technological Facets.*2018; Chapter 3.
133. Ng S., Guo J., Ma J., Loo S. C. J. 2010. Synthesis of high surface area mesostructured calcium phosphate particles. *Acta Biomater.* 6, 3772–3781.
134. Aronov D., Rosen R. E. Z., Rosenman G. 2006. Tunable hydroxyapatite wettability: effect on adhesion of biological molecules. *Process. Biochem.* 41, 2367–2372.
135. Seyrek E., Dubin P. L., Tribet C., Gamble E. A. 2003. Ionic strength dependence of protein–polyelectrolyte interactions. *Biomacromolecules* 4, 273–282.
136. Dasgupta S., Bandyopadhyay A., Bose S. 2009. Reverse micelle-mediated synthesis of calcium phosphate nanocarriers for controlled release of bovine serum albumin. *Acta Biomater.* 5, 3112–3121.
137. Yin G., Liu Z., Zhan J., Ding F. X., Yuan N. J. 2002. Impacts of the surface charge property on protein adsorption on hydroxyapatite. *Chem. Eng. J.* 87, 181–186.
138. Dasgupta S., Bandyopadhyay A., Bose S. 2009. Reverse micelle-mediated synthesis of calcium phosphate nanocarriers for controlled release of bovine serum albumin. *Acta Biomater.* 5, 3112–3121.
139. Wassell D. T. H., Hall R. C., Embery G. 1995. Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite. *Biomaterials* 16, 697–702.

140. Brandes N., Welzel P. B., Werner C., Kroh L. W. 2006. Adsorption-induced conformational changes of proteins onto ceramic particles: differential scanning calorimetry and FTIR analysis. *J. Colloid Interface Sci.* 299, 56–69.
141. Moradian-Oldak J, Paine ML, Lei YP, Fincham AG, Snead ML. J Struct Biol. Self-assembly properties of recombinant engineered amelogenin proteins analyzed by dynamic light scattering and atomic force microscopy. 2000;131:27.
142. Oyane A, Onuma K, Kokubo T, Ito A (1999). Clustering of calcium phosphate in the system $\text{CaCl}_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KCL-H}_2\text{O}$. *J. Phys. Chem B* 103: 8230-8235.
143. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grotzinger J, Yamamoto K, et al (2003) Structural basis of calcium Inhibition by α_2 -HS glycoprotein/fetuin A. *J. Biol. Chem.* 278: 13333-13341.
144. Bruyn J, Goiko M, Mozaffari M, Bator D, Dauphinee R, Liao Y, Flemming R, Bramble M, Hunter G and Goldberg H. Dynamic Light Scattering Study of Inhibition of Nucleation and Growth of Hydroxyapatite Crystals by Osteopontin. *PLOS ONE.* 2013; 8 (2).
145. Uskokovic V, Castiglione Z, Cubas P, Habelitz S. Zeta-potential and Particle Size Analysis of Human Amelogenins. 2010. *Journal of dental research* 89 (2): 149-53.
146. F. Otorola, 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
147. 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).
148. Gavira J.A. Current trends in protein crystallization. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2015;85. 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.
149. Eanes, E.D.; Gillissen, I.H.; Posner, A.S. Intermediate states in the precipitation of hydroxyapatite. *Nature* 1965, 208, 365.
150. Posner, A.S.; Betts, F. Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure. *Acc. Chem. Res.* 1975, 8, 273–281.

151. Kanzaki, N.; Treboux, G.; Onuma, K.; Tsutsumi, S.; Ito, A. Calcium phosphate clusters. *Biomaterials* **2001**, *22*, 2921–2929.
152. Brecevic´, L.; Hlady, V.; Füredi-Milhofer, H. Influence of gelatin on the precipitation of amorphous calcium phosphate. *Colloids Surf.* **1987**, *28*, 301–313.
153. Habraken, W.J.E.M.; Tao, J.; Brylka, L.J.; Friedrich, H.; Bertinetti, L.; Schenk, A.S.; Verch, A.; Dmitrovic, V.; Bomans, P.H.H.; Frederik, P.M.; et al. Ion-association complexes unite classical and non-classical theories for the biomimetic nucleation of calcium phosphate. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1507.
154. Bar-Yosef Ofir, P.; Govrin-Lippman, R.; Garti, N.; Füredi-Milhofer, H. The influence of polyelectrolytes on the formation and phase transformation of amorphous calcium phosphate. *Cryst. Growth Des.* **2004**, *4*, 177–183.
155. Brecevic´, L.; Füredi-Milhofer, H. Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions. *Calcif. Tissue Res.* **1972**, *10*, 82–90.
156. Despotovic´, R.; Filipovic´-Vincekovic´, N.; Füredi-Milhofer, H. Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions. *Calcif. Tissue Int.* **1975**, *18*, 13–26.
157. Christoffersen, J.; Christoffersen, M.R.; Kibalczyk, W.; Andersen, F.A. A contribution to the understanding of the formation of calcium phosphates. *J. Cryst. Growth* **1989**, *94*, 767–777.
158. Pan, H.; Liu, X.Y.; Tang, R.; Xu, H.Y. Mystery of the transformation from amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7415.
159. Cadez V, Erceg I, Selmani A, Domazet D, Suzana S, Lyons D, Kralj D, Dutour S. Amorphous Calcium Phosphate Formation and Aggregation Process Revealed by Light Scattering Techniques. *Crystals*. **2018** (8): 254.
160. Areva S, Peltola T, Sailynoja E, Laajalehto K, Linden M, Rosenholm. Effect of Albumin and Fibrinogen on Calcium Phosphate Formation on Sol–Gel-Derived Titania Coatings in Vitro. *J. Chem Mater.* **2002**;14:1614.
161. Liu XY, Lim SW. Biom mineralization: From Nature to Application. *J Am Chem Soc* **2003**;125:888
162. Han G, Lee S, Kim D, Kim Hoe, Noh J, Park J, Roy S, Ahn T, Jung H. A Simple Method To

Control Morphology of Hydroxiapatite Nano- and Microcrystals by Altering Phase Transition Route. *Crystal Growth and Design*. 2013; 13: 3414-3418.

163. Arellano M, García R. Gasga R. Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by microscopy and X-ray diffraction. *Journal of Physics and chemistry of Solids*. 2009;70 (2): 390-395.

164. A. Bigi, E. Boanini, D. Walsh, S. Mann, *Angew. Morphosynthesis of octacalcium phosphate hollow microspheres by polyelectrolyte-mediated crystallization*. *Chem*. 2000: 41, 2163

165. P. A. Ngankam, Ph. Lavalley, J. C. Voegel, L. Szyk, G. Decher, P. Schaaf, F. J. G. Cuisinier, J. Am. Influence of Polyelectrolyte Multilayer Films on Calcium Phosphate Nucleation. *Chem. Soc*. 2000: 122, 8998.

166. G. Falini, S. Fermani, A. Ripamonti, J. Oriented crystallization of octacalcium phosphate into beta-chitin scaffold. *Inorg. Biochem*. 2001: 84, 255.

167. Terkeltaub E.A. (2001). Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 281, C1-C11.

168. Hough T.A, Polewski M, Johnson K, Cheeseman M, Nolan P.M, Vizor L, Rastan S, Boyde A, Pritzker K, Hunter A.J, Fisher E.M, Terkeltaub R, and Brown S.D (2007). Novel mouse model of autosomal semidominant adult hypophosphatasia has a splice site mutation in the tissue nonspecific alkaline phosphatase gene. *Akp2. J. Bone Miner. Res*. 22, 1397-1407.

169. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe B.D, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin C.J and Rosen V. (2006). BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat. Genet*. 38, 1424- 1429.

170. 144. Lowery J.W, Pazin D, Intini G, Kokabu S, Chappuis V, Capelo L.P and Rosen V. (2011). The role of BMP2 signaling in the skeleton. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*. 21, 177-185.

171. Zhang Y, Xie R.L, Croce C.M, Stein J.L, Lian J.B, van Wijnen A.J, and Stein G.S. (2011). A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 9863-9868.

172. Sun S, Wang Z and Hao Y. (2008). Osterix overexpression enhances osteoblast differentiation of muscle satellite cells in vitro. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 27, 350-356.

173. Thomas G.P, Baker S.U, Eisman J.A and Gardiner E.M. (2001). Changing RANKL/OPG Mrna expression in differentiating murine primary osteoblast. *J. Endocrinol.* 170, 451-460.
174. Komori T. (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J. Cell. Biochem.* 99, 1233-1239.
175. Artigas, N., Ureña, C., Rodríguez-Carballo, E., Rosa, J. L., and Ventura, F. (2014) Mitogen-activated protein kinase (MAPK)- regulated interactions between Osterix and Runx2 are critical for the transcriptional osteogenic program. *J. Biol. Chem.* 289, 27105–27117.
176. Zhou, X., Zhang, Z., Feng, J. Q., Dusevich, V. M., Sinha, K., Zhang, H., Darnay, B. G., and de Crombrughe, B. (2010) Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 12919–12924
177. Rutkovskiy, A., Stensløykken, K. O., and Vaage, I. J. (2016) Osteoblast differentiation at a glance. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 22, 95–106.