



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**EFFECTO DE PÉPTIDO DERIVADO DE LA PROTEÍNA DEL  
CEMENTO 1 EN LA FORMACIÓN Y CRECIMIENTO DE  
HIDROXIAPATITA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**CIRUJANO DENTISTA**

**P R E S E N T A:**

**ALBERTO MIMILA CORTES**

**TUTOR: Dr. GONZALO MONTOYA AYALA**

**ASESOR: Dr. SAMUEL TEHUACANERO CUAPA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



*“Vive como si fueras a morir mañana,  
Aprende como si fueras a vivir para siempre”*

Mohandas Karamchand Gandhi.



## **AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES.**

A mi tutor, Dr. Gonzalo Montoya Ayala, quien me ha brindado de su tiempo, conocimiento y experiencia para iniciar mi camino en la investigación. Expresarle mi gratitud por su apoyo desde mi llegada al laboratorio y que sin ella no podría haber realizado este trabajo. Me abrió las puertas a la etapa más gratificante y de aprendizaje de mi vida como estudiante. Mi gran admiración y respeto.

A los miembros del laboratorio de Biología Periodontal FO DEPeI UNAM, en especial al Dr. Higinio Arzate por el apoyo para realizar mi proyecto de investigación.

A Guadalupe Ureiro, por compartir su tiempo en la asesoría en distintos puntos de mi proyecto y su apoyo en el análisis estadístico.

A mi asesor, Dr. Samuel Tehuacanero Cuapa, por su tiempo y conocimientos aportados en el análisis de resultados obtenidos en las técnicas de microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión, realizadas en el Laboratorio de Microscopía Electrónica en el Instituto de Física UNAM, mostrando profesionalidad en todo momento.

Agradezco al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica LUCE-ICAT UNAM y al Dr. José Ocotlán Flores Flores por la caracterización de las muestras mediante la técnica de Espectroscopía Infrarroja.

A la Dra. Adriana Pérez Soria, a la Mtra. Rita Arroyo Cruz y al Mtro. Kevin López Barrios, por sus aportaciones en la mejora de este escrito.

A mi Facultad de Odontología, y a los académicos que participaron en mi formación profesional, por enseñarme los conocimientos y valores de esta noble carrera.

A mi amada Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de desarrollarme tanto académica como culturalmente permitiéndome conocer, aprender, explorar y vivir todo lo que rodea a esta gran institución y sentirme orgulloso de pertenecer a ella.



## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Principalmente, a mis padres, Alejandra y Gilberto, por su apoyo, esfuerzo, comprensión y cariño que me han brindado en todo momento. Gracias por enseñarme a ser la persona que soy hoy en día, y que, junto a mi hermana Estephani, son el pilar de mi vida, a quienes siempre dedicare todos mis triunfos y mi razón de seguir adelante.

Especialmente, a mi tío Ignacio, por el apoyo que me ha brindado incondicionalmente durante mi camino universitario, es parte fundamental de esta meta cumplida. Mi gratitud y cariño para él, siempre lo tendré presente y espero algún día devolver lo mucho que ha hecho por mi

A toda mi familia, que me brindo cariño y palabras de apoyo para poder seguir adelante. Y a quienes me ofrecieron su confianza al asistir a mis clínicas durante mis primeros años de carrera, que estuvieron ahí cuando lo necesite, mi gratitud hacia ellos es inmensa.

A mis amigos y colegas, Diana L., Ana-María N., Sofía A., Brenda C., Carlos E., José A., Leo F., Martin P. y en general a todos los que compartieron este camino universitario conmigo, siempre pude contar con cada uno de ellos al ofrecerme su amistad y apoyo. Me siento afortunado de haber vivido esta gran etapa con grandes personas a las cuales les aprendí mucho y que tuvimos muchas vivencias que se quedaran a pesar del tiempo.

Agradecer a mi gran amigo Rodrigo, quien desde hace 9 años me ha apoyado y brindado su sincera amistad. Siempre agradecido con la vida de poder contar y conocer a personas como él.

A TODOS MIS SERES QUERIDOS, DE NUEVO, GRACIAS.



# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	
<b>3.1 BIOMINERALIZACIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>3.2 CEMENTO RADICULAR.....</b>	<b>7</b>
<b>3.2.1 PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO (HACD1/CAP) .....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.2 PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1) .....</b>	<b>11</b>
<b>3.3 PÉPTIDOS BIOFUNCIONALES EN EL PROCESO DE MINERALIZACIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>3.4 HIDROXIAPATITA.....</b>	<b>15</b>
<b>3.5 MÉTODOS DE ESTUDIO DE BIOMINERALES.....</b>	<b>17</b>
<b>3.5.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....</b>	<b>19</b>
<b>3.5.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....</b>	<b>21</b>
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>21</b>
<b>5. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>6. HIPÓTESIS.....</b>	<b>22</b>
<b>7. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>23</b>
<b>7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>23</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>8.1 METODOLOGÍA.....</b>	<b>23</b>
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
<b>10. DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>11. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>12. REFERENCIAS.....</b>	<b>43</b>



## 1. RESUMEN

La biomineralización es un proceso donde la formación, crecimiento y madurez de minerales (principalmente cristales de hidroxiapatita) está determinado por la interacción de iones inorgánicos y biomoléculas presentes en distintos tejidos mineralizados. Uno de los tejidos mineralizados es el cemento radicular, a partir del cual se han identificado las proteínas HACD1/CAP y CEMP1. Sin embargo, debido a las propiedades fisicoquímicas inherentes de las proteínas las hacen poco atractivas. En la actualidad, el empleo de péptidos biofuncionales surgen como una alternativa prometedora en la regeneración de tejidos mineralizados.

**Objetivos.** Evaluar el efecto de un péptido derivado de la proteína del cemento 1 (CEMP1) en la formación, crecimiento y madurez de cristales de apatita en un sistema de contradifusión en gel.

**Materiales y métodos.** Selección del péptido a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína CEP1. Se empleó una técnica de cristalización *in situ* para evaluar el efecto en diferentes concentraciones del péptido en la formación de cristales de hidroxiapatita y un sistema de contradifusión en gel para estudiar morfología y maduración de cristales con análisis posterior en técnicas de microscopía electrónica y espectroscopía molecular.

**Resultados.** El péptido seleccionado se designó como CEMP1-p5. Se observó que tienen la capacidad de inducir la formación de cristales de hidroxiapatita *in situ*. Se caracterizaron los cristales obtenidos y se analizaron como muestras control y experimental (con y sin péptido respectivamente) con diferencias significativas en morfología y composición elemental, además con datos cristalinos más puntuales para identificar aparentemente a la muestra experimental como hidroxiapatita.

**Conclusiones.** Nuestros resultados demuestran que el péptido derivado de la proteína del cemento 1 (CEMP1-p5) tienen un papel importante en la formación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita.



## 2. INTRODUCCIÓN

La mineralización biológica es el proceso por el cual los organismos acumulan grandes cantidades de minerales y forman cristales complejos. La formación de los tejidos mineralizados se produce en casi todos los grupos de organismos, desde procariotas (nanocristales de magnetita, en ciertas bacterias), hasta los seres humanos (hueso y órganos dentarios).<sup>1, 2, 3</sup>

La matriz extracelular de todos los tejidos mineralizados comparte gran similitud, sin embargo, tienen propiedades funcionales que los hacen únicos. Estas propiedades son el resultado de las diferencias cuantitativas y/o cualitativas entre sus componentes.<sup>4, 5</sup>

La composición orgánica esencial de los tejidos mineralizados son proteínas, las cuales juegan un papel crítico, no sólo en el proceso de biomineralización sino en distintos procesos biológicos y fisiológicos del organismo, e incluso péptidos que son pequeñas secuencias de aminoácidos presentes en las proteínas con la capacidad de estimular, regular o inhibir numerosas funciones biológicas.<sup>6,7</sup>

En cuanto a la composición inorgánica, se encuentra constituida principalmente por sales de calcio y fosfato en forma de cristales de hidroxiapatita (HA)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , la cual, se deposita en la matriz orgánica. La HA es un compuesto inorgánico que ha sido empleado como uno de los materiales de elección en terapias regenerativas de los tejidos mineralizados.<sup>8, 9</sup>

Dentro de los tejidos mineralizados encontramos al cemento radicular, el cual es un tejido especializado avascular, que se localiza en la superficie radicular de los dientes. Este tejido posee características similares al hueso en cuanto a su composición orgánica e inorgánica, sin embargo, el cemento cuenta con características únicas, ya que no presenta aporte sanguíneo directo, inervación, ni drenaje linfático. La función principal del cemento radicular es servir como el sitio estructural anatómico para la unión de las fibras de Sharpey del ligamento periodontal.<sup>10-12</sup>





A pesar de los avances en el conocimiento de este tejido, su estructura y función ha resultado más compleja. El cemento radicular contiene aproximadamente un 65% de material inorgánico, 23% de material orgánico y 12% de agua. En la matriz extracelular del cemento radicular se han identificado dos proteínas: la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP); dichas proteínas se ha demostrado que juegan un papel muy importante en el proceso de biomineralización, ya que han mostrado alta afinidad por la hidroxiapatita y tienen la capacidad de promover la formación y crecimiento de cristales, así como de inducir la expresión de moléculas relacionadas con la mineralización de los tejidos.<sup>13-15</sup>

Todos estos hallazgos han permitido analizar e identificar secuencias aminoacídicas biofuncionales relacionadas con el proceso de biomineralización. En estudios realizados previamente, los resultados han demostrado la actividad biológica de péptidos derivados de esta proteína al promover el depósito de iones de calcio y fosfato.<sup>16, 17</sup>

En el presente estudio se identificó y empleo un péptido derivado de la proteína del cemento 1 para evaluar su efecto en la formación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita *in vitro*. El análisis secuencial del péptido CEMP1-p5 mostró poseer aminoácidos con posible potencial como inductor de la mineralización.

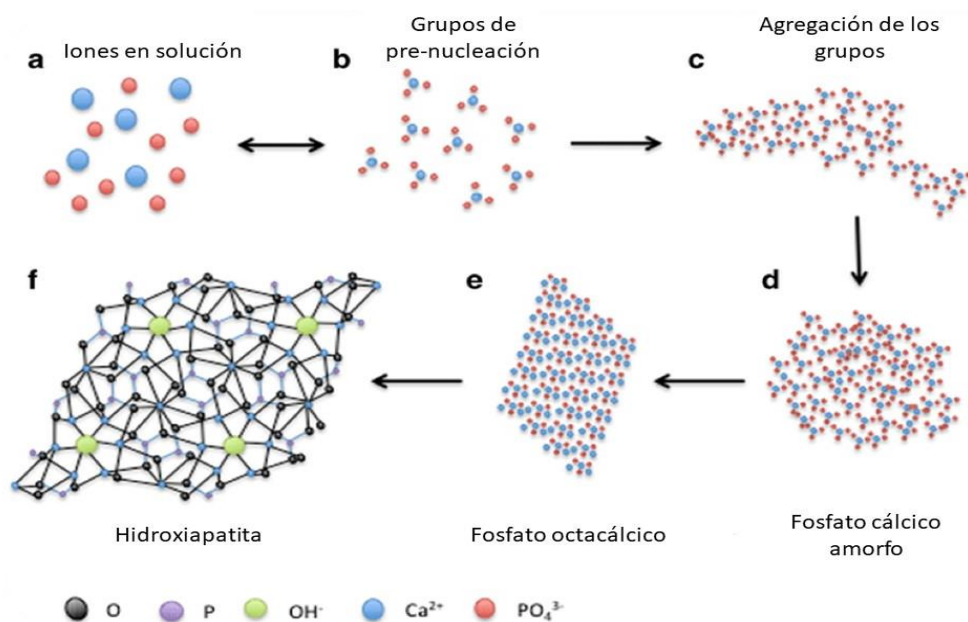
Mediante técnicas de microscopía y espectroscopía molecular, se ha demostrado que el péptido es un inductor en la formación de cristales de hidroxiapatita, así como favorecer su crecimiento y regular la morfología de esta fase mineral.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 BIOMINERALIZACIÓN.

Los tejidos mineralizados de los seres humanos se forman gracias a un proceso fisiológico regulado por interacciones de minerales y moléculas orgánicas, llamado biomineralización. Específicamente, el término biomineral se refiere a compuestos inorgánicos con una disposición de repetición regular de moléculas consistentes, ya sean átomos o iones; producidos bajo condiciones estrictamente controladas con propiedades magnéticas o eléctricas, producto de la interacción de la fase mineral con la fase orgánica y que además determinan características como forma, tamaño, crecimiento y cristalinidad que los hacen distintos de sus equivalentes abióticamente formados.<sup>5,18</sup>

La fase inicial para la formación de un cristal es la nucleación, que se lleva a cabo, a partir de la precipitación de iones disueltos en sobresaturación. El proceso se produce a través de la agregación de iones en fase, desde soluciones individuales para formar un grupo pequeño, conocido como núcleo, mostrado en la **Fig.1.**<sup>5</sup>



**Fig. 1. Nucleación mineral de la Hidroxiapatita.**<sup>19</sup>



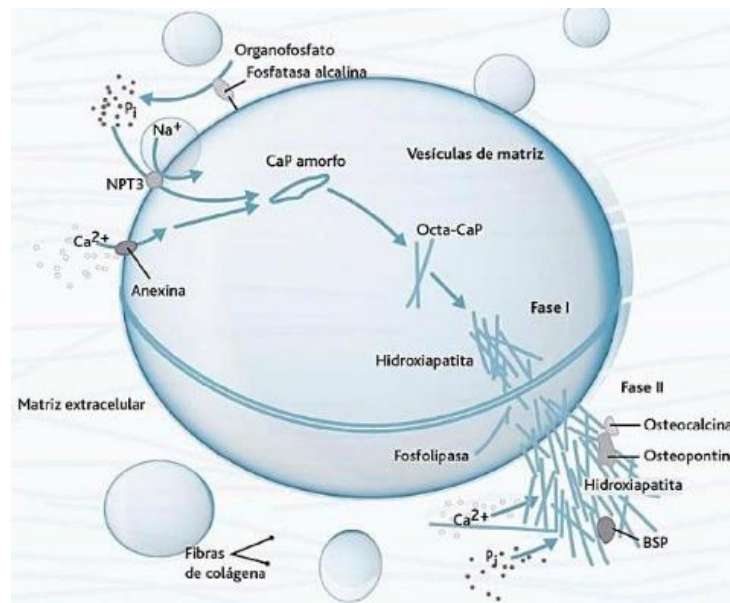
La estabilidad del núcleo depende de su tamaño, que, a su vez, es dependiente del nivel de sobresaturación de la solución. Después de la formación de un núcleo, la tasa de crecimiento de un cristal en una solución sobresaturada es dependiente de la velocidad de transporte o difusión de iones de la red de la superficie del cristal, donde el pH y la temperatura son cruciales para la morfología y cinética de crecimiento.<sup>5</sup>

En el caso de la presencia de macromoléculas biológicas, tales como proteínas o polisacáridos, éstas actúan como plantillas que imitan la red cristalina de una cara particular, facilitando el crecimiento del cristal.<sup>18</sup>

El principal componente inorgánico en el ser humano es la hidroxiapatita, el cual es el biocristal principal de huesos y dientes, ya que les confiere su dureza característica. La hidroxiapatita presente en los tejidos mineralizados se ensambla bajo la influencia de una variedad de proteínas de matriz extracelular, que actúan como promotores o inhibidores del crecimiento cristalino, dando lugar a distintas fases cristalinas hasta llegar a su maduración.<sup>9,20</sup>

El mecanismo molecular de la mineralización de los tejidos duros del cuerpo tiene lugar dentro de las vesículas de matriz de células especializadas (condroblastos, osteoblastos, odontoblastos y cementoblastos), las cuales son secretadas a partir de la superficie celular. Los iones de fosfato de calcio se acumulan dentro de las vesículas, donde eventualmente precipitan y forman cristales de hidroxiapatita. Estos cristales atraviesan la membrana de las vesículas y dan lugar a los nódulos de calcio en el fluido extracelular.<sup>5</sup>

Dichos cristales crecen dentro de la estructura de las fibras de colágena, como se muestra gráficamente en la **Fig. 2**.



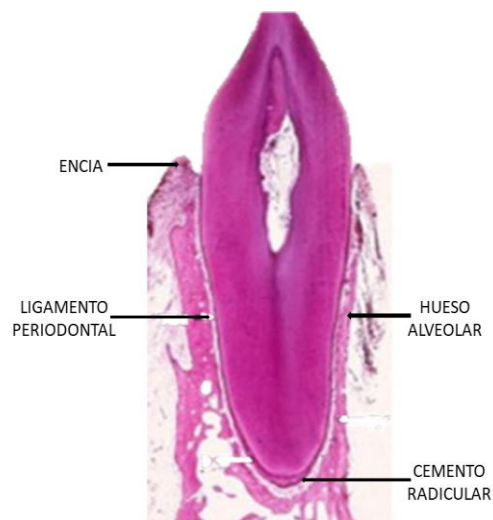
**Fig. 2. Mineralización en vesículas de matriz.<sup>5</sup>**

El grado de maduración y crecimiento de los cristales está determinado por las condiciones extracelulares presentes y donde influyen de manera importante: el pH, la concentración de iones de fosfato, calcio y la presencia de proteoglicanos y proteínas no colágenas de la matriz extracelular de cada tejido.<sup>5</sup>

La cristalización no es un proceso estático, ya que las moléculas constantemente se unen y liberan de la estructura cristalina. La posibilidad de que las moléculas se desprendan de la estructura cristalina depende de las fuerzas de sus enlaces, los cuales pueden ser influenciados por la temperatura. El balance entre las moléculas adheridas y las libres determinan otro factor importante en la cinética de crecimiento y la solubilidad. Un cristal altamente soluble, puede crecer más rápido que cristales menos solubles, incluso en condiciones de supersaturación.<sup>5</sup>

### 3.2 CEMENTO RADICULAR.

El cemento radicular es un tejido conectivo mineralizado que cubre las superficies radiculares, y que, junto con el ligamento periodontal, el hueso alveolar y la encía forman una unidad compleja y funcional denominado periodonto, cuyo principal objetivo es brindar la unión del diente al hueso alveolar de la cavidad oral distribuyendo las fuerzas masticatorias, y además, constituyen un reservorio de células necesarias para la homeostasis, proporciona la interfaz a través de la cual la superficie de la raíz está anclada a las fibras de colágena de Sharpey del periodonto (**Fig. 3**).<sup>12, 21, 22</sup>



**Fig. 3. Corte histológico donde podemos identificar los componentes del periodonto.**<sup>23</sup>

La matriz extracelular del cemento radicular posee características únicas como la ausencia de inervación, vascularización y drenaje linfático; metabólicamente no sufre un proceso de remodelación, pero crece por aposición, formando láminas alrededor de la raíz del diente.<sup>1</sup>

El cemento está compuesto por un 60% de materia inorgánica constituida por sales de calcio y fosfato en forma de cristales de hidroxiapatita y de un 28% de material orgánico, los cuales se resumen en la **Tabla 1**.<sup>12</sup>



COMPOSICIÓN QUÍMICA	% DEL CEMENTO	COMPUESTOS
INORGÁNICA	60%	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hidroxiapatita.</li><li>• Oligoelementos como: flúor, sodio, potasio, hierro, magnesio y azufre</li></ul>
ORGÁNICA	28%	<ul style="list-style-type: none"><li>• Colágena tipo I (95%) y II (5%).<ul style="list-style-type: none"><li>• Glicoproteínas</li><li>• Proteoglicanos</li></ul></li><li>• Proteínas no colágenas como: fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), fibronectina (FN), osteocalcina (OCN), el factor de crecimiento derivado del cemento (CGF).</li></ul>
AGUA	12%	---

**Tabla 1. Composición del cemento.**<sup>12, 24-26</sup>

Se ha demostrado que la formación del cemento es un requisito indispensable para el desarrollo y regeneración de las estructuras periodontales. Al ser un tejido de interfaz entre la dentina y el ligamento periodontal, resulta indispensable para la reparación de la superficie radicular.<sup>6</sup>

En la matriz del cemento radicular se han identificado dos moléculas expresadas por cementocitos, cementoblastos y células progenitoras presentes en el ligamento periodontal que podrían ser clave en la formación de este tejido y además podrían regular las actividades biológicas de las células del ligamento periodontal.

Las dos moléculas polipeptídicas identificadas son: la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) y la proteína del cemento 1 (CEMP1).<sup>11,26</sup>



### 3.2.1 PROTEINA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO (HACD1/CAP).

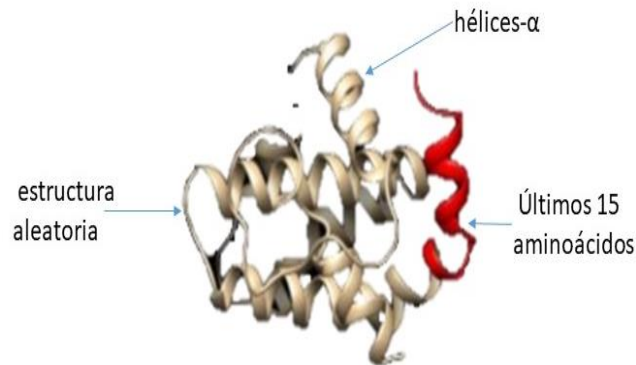
El gen de la proteína CAP se localiza en el cromosoma 10, específicamente entre la región 13-14 del brazo corto de dicho cromosoma. El producto proteico de este gen está formado por 140 aminoácidos (**Fig. 4**).

La proteína de adhesión al cemento es considerada una isoforma derivada de un splicing alternativo de la proteína hidroxilasa coenzima A deshidrogenasa 1 (HACD1), proteína relacionada con el metabolismo de ácidos grasos, diferenciándose la una de la otra en los últimos 15 aminoácidos de la secuencia en el extremo carboxilo terminal. El splicing alternativo ocurre exactamente en el sitio activo de HACD1, por lo que se infiere que su función puede ser diferente. Esta secuencia es única en la base de datos.<sup>26, 27</sup>

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	<b>CCFSIAVIFM</b>	

**Fig. 4. Secuencia de aminoácidos de la proteína de adhesión al cemento.**<sup>28</sup>

El peso molecular teórico es de 14.920 KDa, posee un punto isoelectrico teórico de 7.78, es una proteína hidrofóbica. Su localización se predice como citoplasmática en un 94.19 % debido a la carencia de un péptido señal. Sin embargo, esta proteína se ha inmunolocalizado en la matriz del cemento radicular, en espacios endosteales del hueso alveolar y en zonas paravasculares del ligamento periodontal. Fue la primera proteína aislada del cemento radicular. El modelo teórico de la estructura secundaria de HACD1/CAP está conformado por hélices- $\alpha$  (73%) y estructura aleatoria (27%), como se muestra en la **Fig. 5**.<sup>20, 26, 29</sup>



**Fig. 5. Modelo teórico de la estructura secundaria de HACD1/CAP.**<sup>30</sup>

Se ha determinado que la proteína HACD1/CAP, participa en el reclutamiento y la diferenciación celular durante la formación del cemento radicular. Además, promueve la adhesión y diferenciación de las células osteoblásticas y periodontales de manera preferencial. Las células crecidas en presencia de la proteína HCD1/CAP son capaces de formar un tejido mineralizado, *in vitro*.<sup>7, 29, 31, 32</sup>

En estudios previos, se demostró que está asociada en la formación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita en un sistema libre de células *in vitro*, mostrando capacidad de regular la morfología y fase cristalina. El mecanismo exacto a través del cual HACD1/CAP regula este proceso no está completamente claro, sin embargo, se sabe que la estructura supramolecular en nanoesferas puede promover la deposición de fosfato de calcio mediante la concentración de cargas en la superficie hidrófoba y, por lo tanto, actúa como una plantilla de nucleación interactuando directamente con la hidroxiapatita.<sup>29, 33</sup>

A partir del análisis *in silico* de la proteína HACD1/CAP, se identificó un péptido que corresponde a los últimos 15 aminoácidos de la secuencia, región que se muestra en color rojo en la **Fig. 5**. Dicho péptido posee un peso molecular de 1.65 KDa, un punto isoeléctrico de 5.48 y al realizar pruebas en un sistema de contradifusión en gel libre de células, ha demostrado poseer propiedades idénticas a la HACD1/CAP debido a la alta afinidad de unirse a la hidroxiapatita, así como promover la formación de cristales de dicho mineral mimetizando así las funciones de la proteína completa.<sup>30</sup>

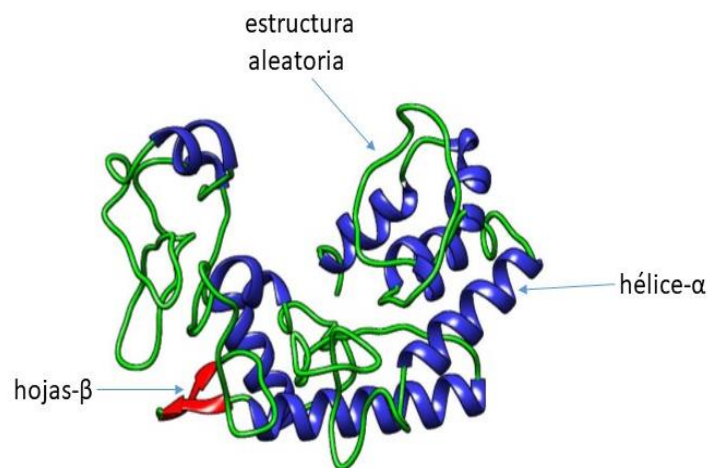




### 3.2.2 PROTEINA DEL CEMENTO 1 (CEMP1).

El gen de la proteína del cemento 1 se localiza en la región 13.3 del brazo corto del cromosoma 16. El ARN mensajero codifica a una secuencia de 247 aminoácidos (**Fig. 7**), cuyo peso molecular teórico es de 25.9 KDa y un punto isoeléctrico teórico de 9,73.<sup>11,26</sup> Se ha demostrado que la expresión proteica se limita a los cementoblastos, a una subpoblación de células del ligamento periodontal y a células ubicadas alrededor de los vasos sanguíneos en el periodonto, por lo que podría ser considerado como un marcador de los cementoblastos.<sup>12, 34, 35</sup>

En la **Fig. 6** se representa la estructura secundaria teórica de CEMP1, compuestas por hélice- $\alpha$  (28%), hojas- $\beta$  (10%) y estructuras aleatorias (62%).<sup>15</sup>



**Fig. 6. Estructura secundaria teórica de CEMP1.**<sup>15</sup>

Esta proteína ha sido implicada en la regulación de la morfología y composición de los cristales de apatitas formados por cementoblastos al poseer una fuerte afinidad a la hidroxiapatita y participar en el proceso de mineralización *in vitro*. Además, regula la expresión de la fosfatasa alcalina, osteopontina y sialoproteína ósea, que son proteínas que participan en la formación y maduración de tejido mineral, así como también, participa activamente en la mineralización de la matriz extracelular de los cementoblastos.<sup>5, 21, 36</sup>



Al analizar la secuencia de aminoácidos de la proteína del cemento 1 (**Fig. 7**) se han identificado regiones con propiedades físico-químicas que podrían emular o mejorar algunas de las características ya reportadas de la proteína CEMP1, por lo que estos dominios podrían presentar excelentes propiedades biológicas.<sup>37</sup>

10	20	30	40	50
<b>MGTSSTDSQQ</b>	<b>AGHRRCSTSN</b>	TSAENLTCLS	LPGSPGKTAP	LPGPAQAGAG
60	70	80	90	100
<b>QPLPKGCAAV</b>	<b>KAEVGIPAPH</b>	TSQEVRIHIR	RLLSWAAPGA	CGRLSTPCAL
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	VCQGQGDTE	GRMTLMG

**Fig. 7. Secuencia de aminoácidos de CEMP1.**<sup>28</sup>

Estudios recientes mostraron que una secuencia identificada como CEMP1p1, conformada entre los aminoácidos 1-20 de la proteína, tiene efecto sobre la proliferación y 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.<sup>28</sup>

Además, otra secuencia aminoacídica ubicada entre los aminoácidos 61-70 promueve la formación y crecimiento de fosfato octacálcico, en un sistema libre de células.<sup>38</sup>



### 3.3 PÉPTIDOS BIOFUNCIONALES EN EL PROCESO DE MINERALIZACIÓN.

Los péptidos son pequeñas secuencias de aminoácidos que pueden cumplir funciones reguladoras de numerosas actividades biológicas e incluso pueden actuar como transmisores de información y coordinar distintas actividades en varios tejidos. Muchos péptidos biofuncionales se han identificado en el interior de la estructura de diversas proteínas, y en algunos otros estudios se han reportado como secuencias libres e inactivas que pueden ejercer determinadas actividades biológicas tras su modificación por hidrólisis química o enzimática.<sup>4,12</sup>

Los péptidos biofuncionales, han sido empleados en distintas áreas como microbiología, farmacología, inmunología y biomineralización. De igual manera han sido ampliamente utilizados para inducir o bloquear pasos clave durante el desarrollo de ciertas actividades celulares, ofreciendo una nueva gama de alternativas para el control de enfermedades.<sup>39</sup>

Los péptidos naturales, que participan en el proceso de biomineralización, son en su mayoría fragmentos de proteínas presentes en tejidos mineralizados, que se sabe que están implicados en la mediación de la formación de fases minerales. La secuencia de aminoácidos en estas proteínas, son capaces de unirse a dicho mineral y crear una plantilla para la integración estructural de moléculas orgánicas e inorgánicas.<sup>4</sup>

En la biomineralización las secuencias ricas en aminoácidos con residuos ácidos tienen la capacidad de unirse con iones metálicos e iniciar el proceso de mineralización. Los péptidos de unión a calcio derivados de la fosfoproteína ácida de la matriz de dentina 1 (DMP1) afectan a la nucleación *in vitro* de hidroxiapatita y la región rica en ácido glutámico de la sialoproteína ósea (BSP) está involucrada en la nucleación de cristales.<sup>4</sup>



La osteopontina (OPN), la cual es una proteína ácida, tiene una región con alto contenido de ácido aspártico, lo cual le brinda la capacidad de unión al calcio de las superficies minerales, por lo cual regula la nucleación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita.<sup>11</sup>

Una de las características que diferencia los péptidos de las proteínas es su estructura primaria, la cual se refiere a la secuencia de aminoácidos que compone los péptidos. Cada residuo dentro de la secuencia peptídica tiene un papel que desempeñar; por lo que, al sufrir modificaciones en la composición de aminoácidos, ya sean fosforilaciones, glicosilaciones, entre otros cambios, pueden potencializar su efecto o incluso inducir una respuesta opuesta.<sup>40</sup>

La mayoría de los péptidos que son críticos para regular la biomineralización poseen la capacidad de unión a iones, como consecuencia del sinergismo que existe entre los diferentes aminoácidos. La histidina y cisteína, por ejemplo, son residuos comúnmente asociados con la unión y la quelación de algunos iones, mientras que la tirosina se sabe que induce la reducción de los iones metálicos en su estado de valencia cero.<sup>40</sup>

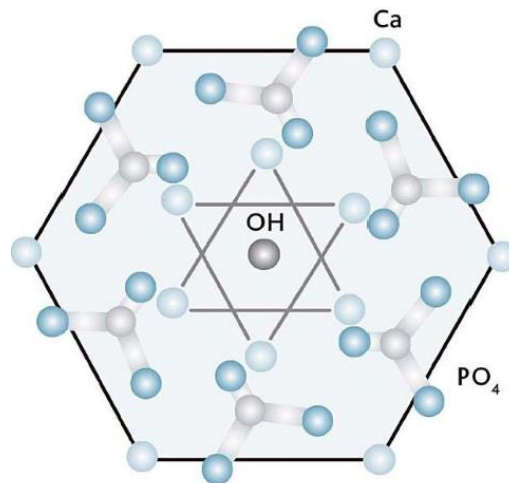
Los residuos ácidos y básicos son responsables de la carga global del péptido y los aminoácidos hidrófobos están implicados en la conformación del péptido, especialmente en un entorno acuoso. De las propiedades de los aminoácidos relacionadas a la mineralización, podemos mencionar: la afinidad de unirse a caras específicas del cristal, la conformación estructural que adopta el péptido durante la adsorción sobre la cara de crecimiento cristalino y la carga neta del péptido en solución que tiene un efecto sobre la cinética y la termodinámica de la biomineralización.<sup>41</sup>



El estudio y empleo de los péptidos ofrecen grandes ventajas con relación a las proteínas, ya que son secuencias cortas que no poseen estructura tridimensional y le brinda mayor estabilidad físico-química, se pueden emplear en altas concentraciones, son relativamente más fácil de sintetizar al compararlos con proteínas, tienen bajo costo de producción por lo que se pueden producir a gran escala, debido a su tamaño y peso molecular es poco probable que puedan inducir una respuesta del sistema inmunológico y a pesar de su tamaño pueden modificar respuestas celulares, desencadenar vías de transducción de señales relacionadas con proliferación y diferenciación celular, entre otros procesos.<sup>40</sup>

### 3.4 HIDROXIAPATITA

Es un biomineral que pertenece al grupo de las apatitas y está constituido por átomos de calcio, fósforo, oxígeno e hidrógeno  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Tiene estructura cristalina hexagonal como se muestra en la **Fig. 8**, cuya celda unitaria está caracterizada por poseer un plano rico en iones calcio con carga positiva y otro plano rico en iones fosfatos e hidroxilos con carga negativa, ambos planos son altamente específicos para la adsorción de diversas moléculas orgánicas que participan en la regulación de la morfología del cristal. La hidroxiapatita pura, contiene 39.68 wt% de calcio (Ca) y 18 wt% de fósforo (P), que dan lugar a la relación Ca/P de 1.67.<sup>5</sup>



**Fig. 8.** Disposición atómica en la celda unitaria hexagonal de la hidroxiapatita.<sup>5</sup>



El carácter iónico de la hidroxiapatita la hace una cerámica dura, refractaria, con punto de fusión mayor a 1500°C, además de proporcionarle la propiedad de insolubilidad a un pH por arriba de 5.5 (pH crítico, donde por debajo de ese valor comienza su solubilización).<sup>5</sup>

En general, las propiedades de la hidroxiapatita varían de acuerdo con el proceso de síntesis. Cuando se obtiene hidroxiapatita sintética, se deben controlar algunos parámetros como son el pH, la temperatura de la reacción, el tiempo de reacción, la atmósfera de tratamiento, entre otros factores; con la finalidad de controlar su composición, la morfología, el grado de cristalinidad, el tamaño de los cristales y la presencia de impurezas.<sup>42</sup>

Se ha demostrado que durante el crecimiento y maduración de la hidroxiapatita se han obtenido sales de fosfato de calcio que incluyen al fosfato de calcio amorfo, así como también una variedad de formas cristalinas que varían en sus propiedades fisicoquímicas (**Tabla 2**).<sup>5</sup>

FOSFATO DE CALCIO	MINERAL	FORMULA QUIMICA	RELACION Ca/P
Fosfato dicálcico	monetita	CaHPO <sub>4</sub>	1
Fosfato de calcio dihidratado	brushita	CaHPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	1
Fosfato β-tricálcico	whitlockita	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.5
Fosfato octacálcico	----	Ca <sub>8</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> -5H <sub>2</sub> O	1.33
Hidroxiapatita	apatita	Ca <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub>	1.67
Fluorapatita	----	Ca <sub>10</sub> F <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub>	1.67

**Tabla 2. Compuestos minerales de sales de calcio.**<sup>5</sup>

Al ser un cristal biocompatible, la hidroxiapatita ha sido empleada en aplicaciones médicas y dentales en forma de gránulos, discos y como revestimiento en la regeneración de tejidos.<sup>5</sup>



Dentro del área biomédica, la hidroxiapatita se puede usar como reemplazo de partes pequeñas de hueso, como relleno de cavidades en odontología, para el refuerzo de materiales compuestos, para la liberación controlada de sustancias biológicamente activas, etc. Una de las principales aplicaciones de este material se encuentra en el recubrimiento de prótesis metálicas con el fin de proveer mayor biocompatibilidad y osteointegración, además de disminuir considerablemente la liberación de iones, producto de la corrosión propia de los materiales, al organismo. De aquí la importancia de obtener hidroxiapatita con las características adecuadas para su aplicación, mediante métodos de síntesis con mayor eficiencia en cuanto a tiempo, costo y calidad del material obtenido.

### **3.5 MÉTODOS DE ESTUDIO DE BIOMINERALES**

Las características críticas de los cristales de hidroxiapatita dependen en gran medida de su microestructura, principalmente de su morfología, estequiometría, estructura cristalográfica y pureza de fase. Se han desarrollado diversas metodologías para la síntesis de hidroxiapatita con características químicas y estructurales específicas, las cuales pueden controlarse mediante los distintos métodos de síntesis química. Un gran desafío en la síntesis de cristales es el control preciso del crecimiento del cristal que se relaciona directamente con el tamaño y la forma geométrica de las partículas. Por lo tanto, es de gran importancia desarrollar emplear procedimientos de síntesis que tengan un control preciso sobre la morfología del cristal.<sup>43</sup>

Entre los diversos métodos de síntesis, la precipitación química convencional es la vía “más sencilla” para la síntesis de hidroxiapatita. Un procedimiento típico implica la adición gota a gota de un reactivo a otro bajo agitación continua y suave, mientras que la proporción molar de Ca/P se mantiene en estequiometría de acuerdo con la proporción de la hidroxiapatita (1.67), de tal manera que se produce un precipitado sólido debido al efecto de difusión o de una reacción química.<sup>42</sup>



Estos precipitados se pueden presentar cuando una sustancia insoluble se forma en una disolución debido a una reacción química o a que la disolución ha sido sobresaturada por algún compuesto. En la mayoría de los casos, el precipitado cae al fondo de la disolución, aunque esto depende de la densidad del precipitado.<sup>43</sup>

Los cristales de hidroxiapatita también pueden sintetizarse mediante la hidrólisis de otras fases de fosfatos de calcio, incluyendo fosfato dicálcico anhidro (DCPA), fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) y fosfato tricálcico (TCP). La hidrólisis de estas fases se realiza normalmente mediante procesos de disolución y precipitación. De hecho, la formación de cristales a través de otros métodos también procede a través de una o más fases intermedias que tienen una existencia transitoria.<sup>43</sup>

Otro método es el llamado sol-gel, que comprende varias transformaciones tanto físicas como químicas. El proceso recibe su nombre de la transición que se produce de una solución coloidal a otra, es decir, de sol a un gel. Un sol es una solución coloidal en la que la fase continua (la que se encuentra en mayor proporción) es una sustancia en estado líquido y la fase dispersa (la que se encuentra en menor proporción) es otra sustancia en estado sólido.<sup>42</sup>

Las reacciones de hidrólisis y de condensación son las que se llevan a cabo para formar el sol y el gel, respectivamente. El mecanismo y la velocidad de la reacción se pueden alterar fácilmente modificando las condiciones del proceso, como la temperatura, el pH (para el caso de las soluciones acuosas), el solvente empleado, la cantidad de reactivos usados, los precursores empleados, la presión del sistema, etc.<sup>42</sup>

Como se ha mencionado respecto a la mineralización, la primera fase de formación de cristales es a partir del núcleo, donde se inicia el crecimiento de los cristales y donde su fase mineral será influenciada por el tiempo, estabilidad termodinámica, saturación de iones, temperatura y pH. Alrededor del núcleo, existen disposiciones a partir de las cuales es más sencilla la adición de nuevos iones, las denominadas caras de crecimiento cristalino.<sup>44</sup>





La tendencia general de los iones en disolución es llenar huecos, completar, formar y terminar caras de crecimiento cristalino. Y con el tipo de crecimiento tendrá influencia en la morfología del cristal.<sup>44</sup>

Para la caracterización y estudio de los cristales, en general, se emplean diferentes metodologías, que con el avance de la tecnología nos permiten obtener datos estructurales y morfológicos más precisos, además de identificar planos cristalinos que nos permiten diferenciar cada una de las fases de las apatitas; como es el caso de las técnicas de microscopías y de espectroscopia molecular.

La microscopía es un conjunto de técnicas y métodos destinados a hacer visibles los objetos de estudio que por su pequeñez están fuera del rango de resolución del ojo humano. Si bien el microscopio es el elemento central de la microscopía, el uso del mismo requiere de todo un conjunto de métodos y técnicas afines al aparato para producir las imágenes adecuadas.<sup>45</sup>

El microscopio óptico es un sistema de lentes convergentes que cumplen la función de magnificar la imagen de un objeto. El poder resolutivo del microscopio de luz, está limitado por la longitud de onda de la luz visible que utiliza; sin embargo, ciertas técnicas de la microscopía de luz, han ayudado a aumentar el alcance de éste instrumento. Una de éstas técnicas se conoce como microscopía de campo oscuro, en éste método se utilizan lentes que desvían los rayos de luz de manera que sólo la luz que pasa a través del espécimen llega hasta el ojo del observador, esto hace que el objeto parezca brillante sobre un fondo oscuro.<sup>46</sup>

### **3.5.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) se encuentra principalmente compuesto por un emisor de electrones, una columna y diferentes lentes electromagnéticas con la finalidad de llevar a cabo un barrido superficial de la muestra. Las señales son capturadas por distintos tipos de detectores, ayudando a obtener información morfológica y de composición química superficial de la muestra.<sup>47</sup>



En el pasado, las muestras que se observaban por SEM debían ser conductoras, para evitar que se cargaran o se calentaran cuando fueran irradiadas por el haz de electrones. Si las muestras no eran conductoras (como la hidroxiapatita y otros materiales cerámicos y poliméricos), había que recubrirlas con una película metálica (oro, oro-paladio, cromo o carbón) con el fin de evitar dichos inconvenientes y mejorar la calidad de las imágenes obtenidas.<sup>45</sup>

Estos recubrimientos eran imperceptibles a escalas micrométricas, pero a menores escalas provocaba cierta incertidumbre en la imagen observada, ya que no se sabía si lo que se estaba observando era el material de estudio o el recubrimiento metálico. En la actualidad, los microscopios SEM cuentan con mejores instrumentos de descarga para las muestras, lo que permite observar materiales cerámicos a escalas nanométricas sin necesidad de usar recubrimientos conductores.<sup>45</sup>

Una de las herramientas adicionales de SEM es la espectroscopia por dispersión en energía de rayos X (EDS), la cual se basa en la detección de la radiación X que emite el material excitado por un haz de electrones enfocado en un área muy pequeña. Estos electrones, con energía del orden de las decenas de keV, producen transiciones energéticas en los átomos comprendidos en un volumen de aproximadamente  $1 \mu\text{m}^3$ . Estas transiciones, que involucran los niveles atómicos más internos, producen fotones en el espectro de los rayos X que son característicos de cada tipo de átomo y analiza la composición elemental del material.<sup>45</sup>

Otra técnica de microscopía viable para el estudio de biominerales es el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM). Representa la extensión natural del microscopio óptico compuesto, hace uso del carácter ondulatorio de los electrones, junto con la posibilidad de refractarlos utilizando lentes magnéticas adecuadas, estableciéndose un paralelismo entre la óptica luminosa y la óptica electrónica. Además, la técnica de difracción de electrones permite realizar estudios cristalográficos a una escala igual o mayor que  $1 \mu\text{m}$ .<sup>45</sup>



En el modo de alta resolución (HRTEM) es posible, incluso, llegar a resoluciones de pocos Å, permitiendo la visualización de los planos atómicos que forman el material. En este análisis es de gran ayuda el empleo del tratamiento digital de las imágenes para así, tras la optimización señal / ruido, obtener resultados mucho más precisos. En las últimas décadas, distintas técnicas de análisis se han incorporado a este microscopio aumentando sus posibilidades.<sup>48</sup>

### **3.5.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA**

Los métodos espectroscópicos instrumentales están basados en la interacción de la energía radiante con la materia. Al hacer incidir radiación electromagnética sobre los compuestos, éstos presentan cierto comportamiento, que depende de la energía que posee la radiación. El registro de esta interacción nos permite identificar grupos funcionales del compuesto, así como establecer o confirmar estructuras moleculares. Las uniones químicas de cada grupo funcional presentan movimientos vibracionales a frecuencias características y por lo tanto absorben radiación infrarroja de diferentes frecuencias. El espectro de infrarrojo es la gráfica donde se muestran las frecuencias de absorción de energía de cada grupo funcional. Por lo que de cada compuesto se obtiene un espectro característico.<sup>49</sup>

## **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En el proceso de biomineralización, estudios han demostrado que la estructura de las proteínas juegan un papel importante en la nucleación y crecimiento de la hidroxiapatita, sin embargo, factores ambientales como pH, temperatura e incluso la presencia de proteasas (enzimas que degradan la estructura de las proteínas) pueden condicionar la función de las mismas; es por esto, que se han realizado diversos estudios para identificar secuencias cortas denominados péptidos con la capacidad de mimetizar y mejorar la eficiencia de dichas macromoléculas. Uno de los retos actuales en la utilización de péptidos que regulan la biomineralización es entender el mecanismo por el cual interactúan estas moléculas con biocristales.



Algunos investigadores plantean que dicha interacción está determinada por la presencia de aminoácidos específicos con carga negativa.

Otros autores mencionan que son interacciones electrostáticas que se establecen por la cercanía entre caras específicas del cristal con nubes electrónicas formadas por las secuencias peptídicas, sin tener una teoría específica, pero si diversos planteamientos de cómo las moléculas orgánicas condicionan la morfología, crecimiento y madurez de fases minerales.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, el trabajo con péptidos biofuncionales ha permitido contrarrestar el costo técnico y económico de trabajar con moléculas estructuralmente complejas como las proteínas. Se han identificado secuencias funcionales con repeticiones de aminoácidos negativos como aspartato, glutamato y serinas que tienen la capacidad de controlar la formación y crecimiento de biocristales e incluso se han realizado modificaciones en dichas secuencias para potencializar su efecto.

En este trabajo, nos enfocamos en identificar una secuencia derivada de la proteína del cemento radicular, que ha demostrado un papel importante en la biomineralización, como molécula reguladora de la formación y crecimiento de cristales de hidroxapatita *in vitro*. Los resultados generados a partir de este estudio aportarán información sobre el proceso de formación de la hidroxapatita a partir de secuencias peptídicas. Los nuevos conocimientos obtenidos podrían dar lugar a implementar terapéuticas con pronóstico predecible para el tratamiento o regeneración de tejidos mineralizados afectados por diversas patologías.

## 6. HIPÓTESIS

Las propiedades bioquímicas del péptido derivado de la proteína del cemento 1 (CEMP1-p5), modulan la formación y crecimiento de cristales de hidroxapatita en un sistema *in vitro*.



## 7. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel del péptido derivado de la proteína del cemento 1 (CEMP1-p5) en la formación y maduración de cristales de apatitas *in vitro*.

### 7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar las características fisicoquímicas del péptido seleccionado y evaluar el efecto de dicho péptido derivado de la proteína del cemento 1 (CEMP1-p5) en la formación de cristales de apatita.
2. Caracterizar con microscopía electrónica y espectroscopía molecular los precipitados formados en presencia y ausencia del péptido CEMP1-p5, dentro de un sistema de gel-sol.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### VARIABLES INDEPENDIENTES

- Presencia o ausencia del péptido.
- Temperatura de manejo a 37°C.
- pH de manejo en 7.4.

### VARIABLES DEPENDIENTES

- Formación de cristales
- Crecimiento de cristales

### 8.1 METODOLOGÍA.

#### IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DEL PEPTIDO ESTUDIADO.

Para la selección del péptido en el presente estudio, primero se identificó la secuencia aminoacídica de la proteína del cemento 1 (CEMP1) con ayuda de la base de datos del Protein Data Bank. Tomando en consideración propiedades fisicoquímicas como hidrofobicidad, posible estructura secundaria, se emplearon diferentes programas computacionales: SOPMA, GOR4, HMMTOP, TMHMM y Tmpred, para obtener secuencias consenso relacionadas al proceso de biomineralización.



El péptido seleccionado se sintetizó por el método FMOC/tBu mediante la técnica de fase sólida (se solicitó la producción comercial del mismo a New England Peptide, Gardner, MA, USA). Este método de síntesis peptídica es de los habitualmente usados, en la cual la síntesis peptídica progresa desde el extremo C-terminal al extremo N-terminal.

### **FORMACIÓN DE CRISTALES DE HIDROXIAPATITA *in situ*.**

Para determinar el efecto del péptido derivado de CEMP1 en la formación *in situ* de cristales de apatita, se colocó en una placa de 96 pozos Nunc maxisorp, 10 $\mu$ L de solución de Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20mM y NaCl 150mM a pH 7.4); 80 $\mu$ L de solución buffer (HEPES 50mM, NaCl 150mM, a pH 7.4) con diferentes concentraciones del péptido (1, 2.5, 5, 10, 15 y 20  $\mu$ g), y 10 $\mu$ L de solución de Calcio ( $\text{CaCl}_2$  50mM, HEPES 50mM, NaCl 150mM a pH 7.4).

Se agregaron dichos volúmenes en pocillos de precipitación de cajas de 96 pozos. Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente por 4 hrs. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el líquido cuidadosamente dejando los cristales precipitados en el fondo durante toda la noche.

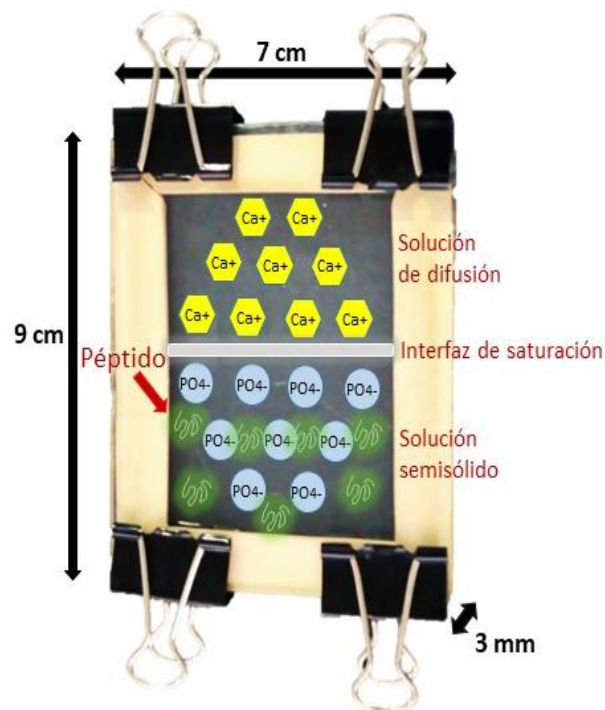
Posteriormente, se agregaron 50  $\mu$ L de Alizarina Roja S (al 0.5%, pH 4.2) a cada pozo por 20 seg. Al tener todos los pozos con tinción, se agregaron 100  $\mu$ L de solución de cloruro de Cetilpirimidino por 1 hr a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 570 nm mediante el empleo del espectrofotómetro Filter Max F5 de Molecular Devices. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

### **ENSAYOS DE CRISTALIZACIÓN MEDIANTE EL SISTEMA DE CONTRADIFUSIÓN EN GEL.**

Para evaluar el papel del péptido en la precipitación de cristales, se utilizó un sistema semisólido a base de silicato. Para la preparación del gel se emplearon 2 mL de metasilicato de sodio 1.06 g/mL, 1.8 mL de buffer HEPES 10 mM (pH 7.4), 0.2 mL de HEPES más azida de sodio 1% y 1.08 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 M, se ajustó el pH a 7.4.

La solución se agregó a casetes formados, cada uno, por 2 placas de vidrio (7 cm x 9 cm) separados por un marco de neopreno de 3 mm de grosor y sellados con grasa para vacío, como se ilustra en la **Fig. 9**.

Se agregaron 5 mL de la solución de metasilicato y fosfato (gel), previo a su gelificación se agregó el péptido (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el grupo experimental, además, se empleó un grupo control sin péptido. Una vez formado el gel, se añadieron 5 mL de una solución de difusión a base de  $\text{CaCl}_2$  100 mM disuelto en buffer HEPES 10 mM a pH 7.4. Todos los casetes se incubaron en una estufa a  $37^\circ\text{C}$  durante 7 días.



**Fig. 9.** Casete utilizado en sistema de contradifusión en gel, donde precipitaran los iones desde una fase móvil (solución de calcio) hacia un gel con iones fosfato.

## RECUPERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS CRISTALES.

Transcurridos los días de incubación, los cristales fueron separados del gel con ayuda de un microscopio estereoscópico (Stemi SV11 Carl Zeiss), recolectados con una aguja fina, y se mantuvieron en campana de vacío hasta su análisis. La morfología y microestructura de las partículas precipitadas (con y sin péptido) se analizaron con microscopía óptica y con microscopía electrónica de barrido.



La composición elemental se determinó por medio de una microsonda y se calculó la proporción Ca/P mediante el análisis químico elemental utilizando espectroscopia por dispersión de energía de Rayos X (EDS), con porcentajes atómicos de los elementos identificados en el espectro.

Para determinar los grupos funcionales presentes en los depósitos formados, se realizó el estudio de las muestras con espectroscopía infrarroja. Mediante el análisis del espectrómetro obtenido, se buscó la presencia de grupos fosfato y carboxilo característicos de las apatitas. Para dicho estudio se prepararon las muestras con la técnica de pastilla. Esta técnica consiste en pulverizar en un mortero de ágata 0.010 mg de muestra y 1 mg de un medio de soporte a base de bromuro de potasio (KBr). A la mezcla se le aplicó una presión de 3000 lbs/in<sup>2</sup> por 1.5 minutos para obtener la pastilla.

Para estudiar las distancias interplanares de los cristales se analizaron con Microscopia Electrónica de Transmisión (JEM-2010F) y con transformada de Fourier se buscaron identificar planos cristalinos característicos de la hidroxiapatita comparando con base de datos internacionales de minerales con importancia biológica ICDD.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se reportan como el promedio de duplicados  $\pm$  desviación estándar de la media. Para determinar una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los resultados se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida de una prueba Dunnett's realizando comparaciones múltiples entre el grupo control con los grupos de concentración de péptido. Al análisis mostro un valor de  $p < 0.0001$ .





## 9. RESULTADOS.

### IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DEL PÉPTIDO ESTUDIADO.

Al realizar un análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína CEMP1, se identificó y seleccionó una secuencia de aminoácidos ubicada entre los aminoácidos 221-231, cercanos al extremo carboxilo de la secuencia total de la proteína. Dicha secuencia se identificó como CEMP1-p5, la cual, está conformada por 11 aminoácidos: 3 Serinas (S), 2 Prolinas (P) y 1 Ac. Glutámico (E), Alanina (A), Histidina (H), Arginina (R), Cisteína (C) y Glicina (G). Es un péptido hidrofílico, y de carácter ácido ya que su punto isoeléctrico es de 6.84; además, cuenta con 2 aminoácidos con carga positiva (A, H), 1 con carga negativa (E) y 8 sin presencia de carga. El péptido tiene una masa molecular de 1.127 KDa, y cuenta con una pureza mayor al 90%.

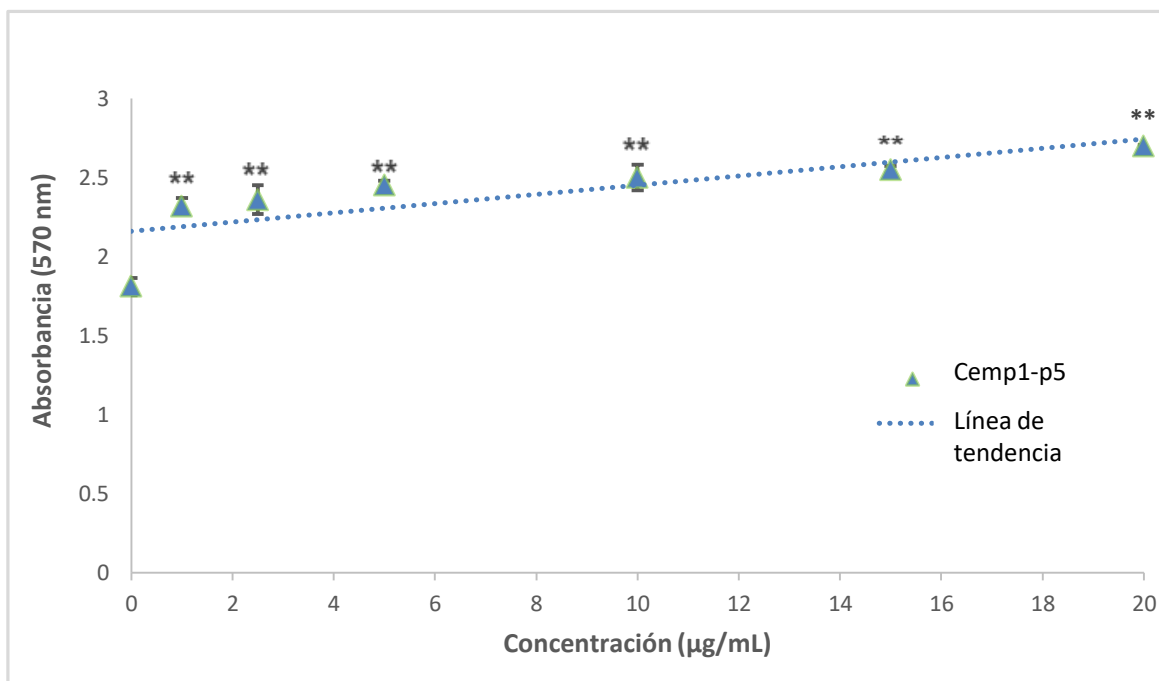
PÉPTIDO	CEMP1-p5
No. aminoácidos	11
Secuencia de aminoácidos	EAHPPRSCSGS
Peso molecular	1.1272 KDa
Punto Isoeléctrico	6.84

**Tabla 3. Características fisicoquímicas del péptido seleccionado calculadas de manera virtual a través de ExPasy y Scansite.**



## FORMACIÓN DE CRISTALES DE HIDROXIAPATITA *in situ*.

Para los ensayos de cristalización *in situ* se emplearon diversas concentraciones (0, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{g/mL}$ ) del péptido con el objetivo de observar el efecto de distintas concentraciones sobre la formación de cristales de hidroxiapatita. Los resultados expuestos en la **Fig. 10**, muestran que todas las concentraciones empleadas del péptido CEMP1-p5 promueven la formación de cristales de hidroxiapatita, de manera dependiente al incrementar la concentración de cada uno. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple (Dunnett's), indicando diferencia significativa del grupo control vs los grupos de concentración de péptido a la inducción de formación de cristales, mostrando un valor  $p < 0.0001$ .



**Fig. 10.** Efecto de diversas concentraciones del péptido CEMP1-p5 sobre la formación de cristales de hidroxiapatita *in situ*, donde se observa la tendencia positiva de los péptidos a promover la formación de cristales de hidroxiapatita.  $p < 0.0001$



## ENSAYOS DE CRISTALIZACIÓN MEDIANTE EL SISTEMA DE CONTRADIFUSIÓN EN GEL.

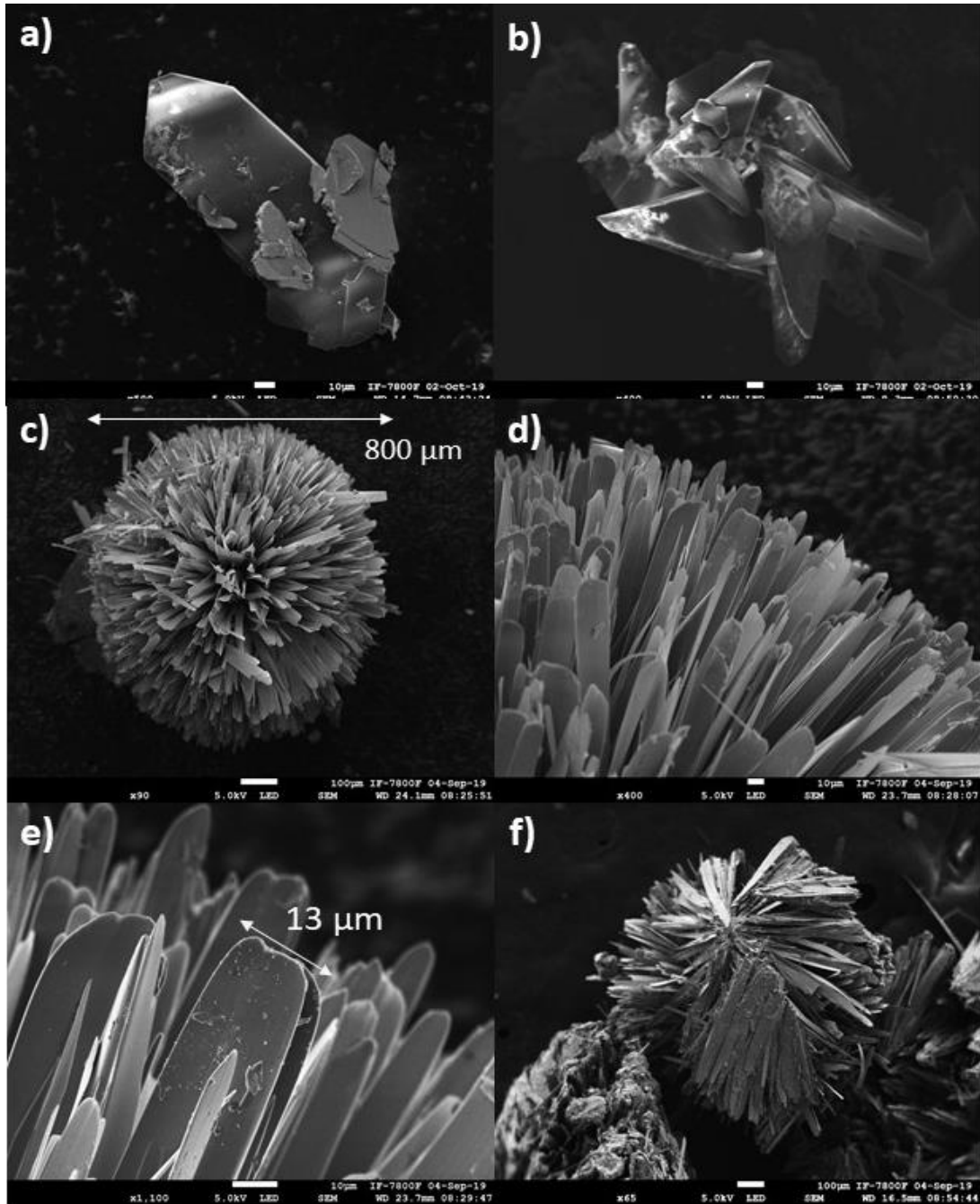
A partir de los ensayos de cristalización *in situ*, se empleó la concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$ , para evaluar el efecto del péptido sobre el crecimiento de cristales mediante el sistema de contradifusión en gel. Una vez transcurrido el tiempo de incubación (7 días a 37°C), los cristales formados se recuperaron con una aguja fina y con apoyo de un microscopio estereoscópico. Los cristales fueron almacenados en tubos Eppendorf de 1.5ml para su posterior procesamiento y análisis con técnicas analíticas expuestas a continuación.

### **Microscopio Electronico de Barrido (SEM).**

Los cristales se montaron en cinta carbón de portamuestras a base de aluminio, se colocaron en una cámara de alto vacío y se observaron en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (SEM-Jeol 7800F).

Los cristales obtenidos de la muestra control (formados en ausencia del péptido), fueron recolectados de la interfaz entre el gel y la solución de calcio; al ser analizados, presentaron diversas morfologías que van desde placas hasta depósitos irregulares donde el crecimiento es laminar; dichos cristales se formaron por la difusión y precipitación de iones calcio desde la fase móvil hacia el gel de metasilicato.

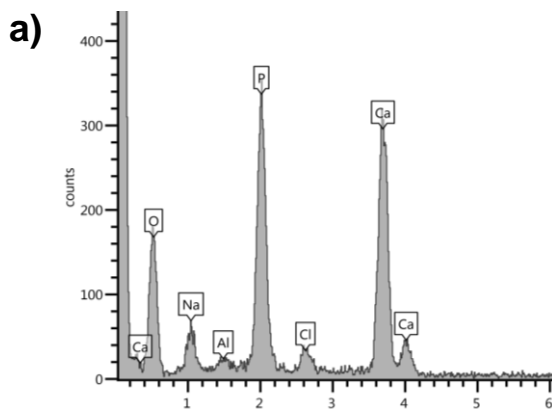
Mientras que los cristales formados en presencia de CEMP1-p5 presentaron una morfología en esférulas de aproximadamente 800  $\mu\text{m}$ , conformadas por delgadas láminas que emergen de un núcleo. Los crecimientos laminares presentan diversos tamaños debido a que se fusionan para formar placas. **Fig. 11**



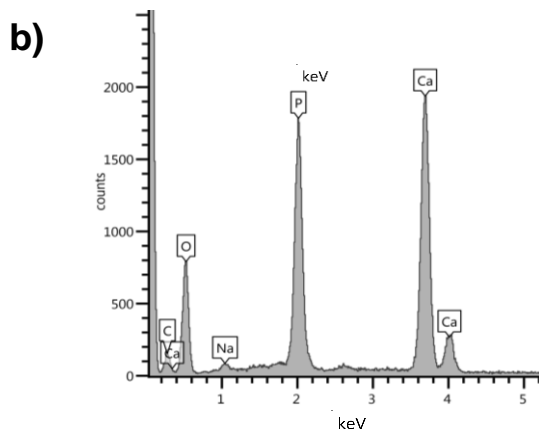
**Fig. 11. Microfotografías obtenidas en SEM de los cristales formados en ausencia y presencia de péptido CEMP1-p5. a) y b) Cristales de la muestra control con morfología de placas irregulares; c) Cristal formado en presencia del péptido con morfología esferoide, d) y e) crecimiento cristalino laminar, f) núcleo cristalino.**



Al realizar el análisis semicuantitativo de la composición química elemental de los cristales de la muestra control observamos la presencia de Oxígeno, Calcio, Fosforo, Sodio, Cloro y Aluminio; elementos presentes en el del sistema de gel de metasilicato. El análisis de los cristales en presencia de CEMP1-p5 nos permitió identificar la presencia de Oxígeno, Calcio, Fosforo y Sodio. La relación Ca/P para la muestra control es de 1.3, mientras que los depósitos cristalinos que se formaron en presencia de CEMP1-p5 es de 1.75; lo cual nos indica que son depósitos relacionados con apatitas.



Elemento	Concentración aparente	% Atómico
O	0.89	62.31
Na	0.13	3.78
Al	0.02	0.50
P	0.99	13.53
Cl	0.07	1.31
Ca	1.19	18.56
<b>Total:</b>		<b>100.00</b>



Elemento	Concentración aparente	% Atómico
C	0.21	15.57
O	2.05	51.70
Na	0.06	0.56
P	2.85	11.95
Ca	4.23	20.23
<b>Total:</b>		<b>100.00</b>

**Fig. 12. Resultados del EDS de la muestra control (a), y de los cristales formados en presencia del péptido CEMP1-p5 (b).**



## Espectroscopia Infrarroja (FTIR).

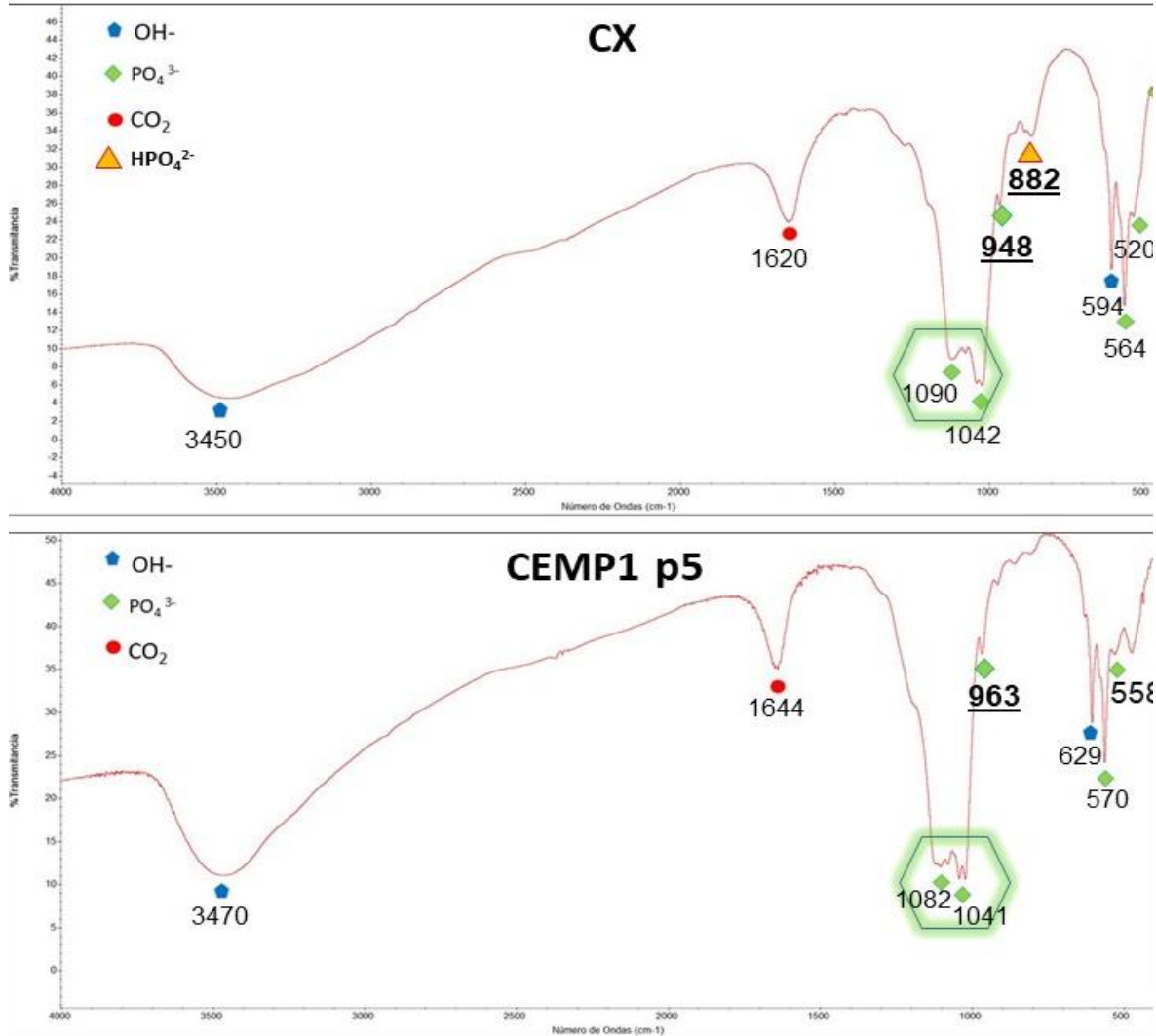
Las muestras se procesaron mediante un mortero de ágata para obtener polvo y se condensaron en un pastillero; las muestras se analizaron con un equipo de espectroscopía infrarroja (Nicolet Nexus 670 FT-IR) para identificar grupos funcionales presentes en las muestras tanto control como las muestras experimentales.

Los espectros obtenidos de la muestra control y experimental se analizaron y compararon con estudios reportados por Raynaud, et al., 2002, Destainville, et al., 2003, Meejoo, et al., 2006, Marín, et al., 2007, acerca de la síntesis y análisis con espectroscopia infrarroja de apatitas puras y fases minerales precursoras.

El grupo hidroxilo (OH<sup>-</sup>) forma bandas de absorción infrarroja intensiva a 600-630 y 3420-3570 cm<sup>-1</sup>. El grupo fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) forma bandas representativas a 560-600 y 950-1100 cm<sup>-1</sup>, siendo la banda a intensidad 960 cm<sup>-1</sup> la característica de la hidroxiapatita pura. Las bandas a intensidad 1450-1640 cm<sup>-1</sup> son correspondientes al CO<sub>2</sub> captado durante el análisis del espectrómetro.

En los resultados del espectro de la muestra control se identificaron bandas presentes de grupos hidroxilo (OH<sup>-</sup>), y grupos fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), pero tras el análisis se observaron datos no cercanos a la intensidad de las bandas características de la hidroxiapatita, además se identificó la intensidad de una banda a 882 cm<sup>-1</sup> (referente a HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) en el espectro, que caracteriza a las fases minerales con deficiencia de calcio.

En los resultados del espectro de la muestra experimental, se identificaron bandas presentes de grupos hidroxilo (OH<sup>-</sup>), y grupos fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), que, al analizar y comparar corresponden aparentemente a hidroxiapatita al presentar intensidad muy cercana a las bandas características de dicha fase mineral, principalmente por la banda 963 cm<sup>-1</sup> (grupo fosfato). (**Fig. 13**).



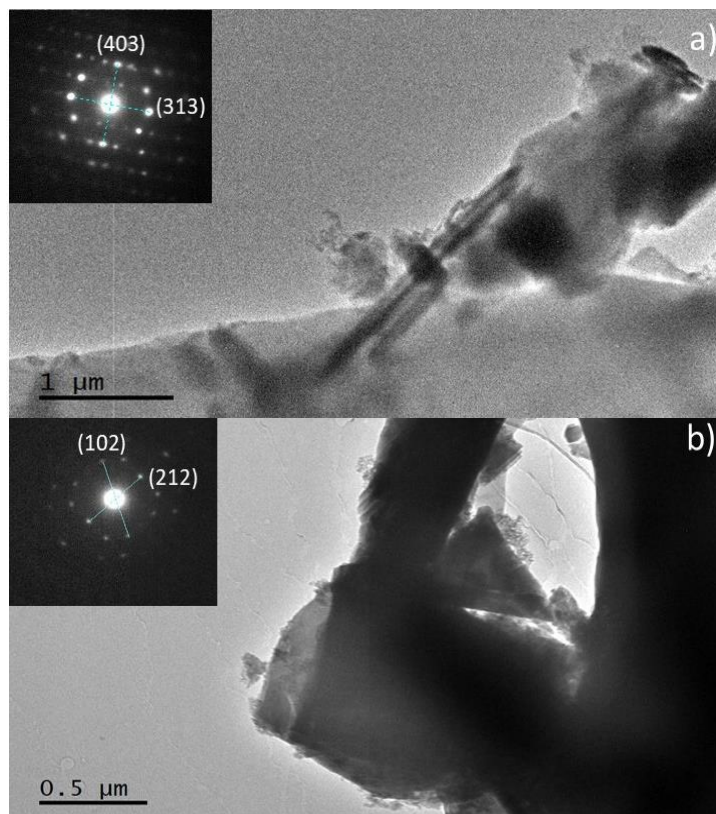
**Fig. 13. Espectro FTIR de las muestras control y experimental. El análisis comparativo de las bandas obtenidas entre ambas muestras, nos permite identificar picos más definidos en la muestra experimental, lo que demuestra la pureza y madures de los cristales.**

Parte de las muestras en polvo, obtenido del procesamiento con el mortero de ágata, se resuspendió en isopropanol y se colocó en una rejilla metálica recubierta de carbono. Con ayuda de un microscopio electrónico de transmisión (TEM, JEM-2010F) se obtuvo la resolución atómica y las reflexiones cristalinas; mediante el análisis de las imágenes se obtuvieron las distancias interplanares de los cristales formados.



## Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM).

Los cristales formados con CEMP1-p5 muestran las distancias interplanares 1.52 Å, 1.61 Å que, al ser analizadas con la transformada de Fourier, identificamos los planos cristalinos (403) y (313) respectivamente, las cuales corresponden a la fase mineral de Hidroxiapatita (de acuerdo a tablas de Cristalografía Internacionales JCPDS 44-078.2001), mostrado en el cuadro **a)** de la **Fig. 14**. Se realizó un segundo análisis con transformada de Fourier para identificar diferentes planos cristalinos a los ya identificados mostrado en el cuadro **b)**; se midieron las distancias interplanares 2.29 Å, 3.16 Å, identificando los planos cristalinos (212) y (102) respectivamente. Los cristales de la muestra control mostraron un grado bajo de cristalinidad, por lo que, al ser analizados bajo el haz de electrones emitidos por el microscopio de transmisión, se observó la degradación de la muestra.



**Fig. 14. Microfotografías obtenidas en TEM a) Muestra cristalina con transformada de Fourier. b) segunda zona analizada de la muestra con transformada de Fourier ubicando los planos cristalinos (112) y (212).**





## 10. DISCUSIÓN

La biomineralización es un proceso altamente controlado por células especializadas en la secreción de una matriz mineralizada como osteoblastos, odontoblastos, cementoblastos, ameloblastos y condroblastos mediante la liberación de vesículas donde convergen los componentes inorgánicos, así como los componentes orgánicos, es decir proteínas, que dan origen a la formación de los biominerales como hidroxiapatita, e incluso, se puede llevar a cabo el proceso de biomineralización de manera ectópica (patológico) influenciado por altas concentraciones de iones, en regiones de baja fluencia de líquidos y donde posiblemente hay deficiencia de proteínas que regulen la formación de cristales dando como resultado la formación de depósitos de calcio.<sup>40, 50</sup>

Los intentos por aclarar los factores que afectan la precipitación de minerales biológicos han producido diversos ensayos con el objetivo de evaluar su tasa de crecimiento. De acuerdo con estudios realizados por Bouropoulos et al. 2001 y Aizenberg et al. 1995, concluyeron que la forma de un cristal refleja la naturaleza del entorno en el que crece.<sup>4</sup>

En la biología de este entorno y, por lo tanto, las formas del cristal y, en particular, las caras del cristal pueden arrojar mucha luz sobre los mecanismos de crecimiento. En estudios pioneros, simplemente se preparaban soluciones sobresaturadas de fosfato de calcio y se realizaba el análisis del déficit en la concentración de los iones con respecto al tiempo.<sup>40</sup>

Estos métodos poseen ciertas desventajas como: 1) la concentración de componentes minerales, tales como calcio y fosfato, pueden disminuir en el transcurso del experimento por lo que se reduce la fuerza motriz para la precipitación, y 2) debido a la disminución incesante en la concentración de iones, los experimentos tenían que empezar a nivel de sobresaturación con varias fases minerales estables distintas de hidroxiapatita.<sup>51</sup>



La primera fase de formación de un cristal es a partir de un núcleo, donde la saturación de iones, la estabilidad termodinámica, el pH, la temperatura, y la presencia de macromoléculas juegan un papel importante en el crecimiento y fase mineral.

Hoy en día se han desarrollado diversas estrategias que han permitido tener un mejor control en la precipitación de iones para formación y crecimiento de cristales de importancia biológica, como es el caso de sistemas a base de una solución móvil, donde un ion en sobresaturación difunde a través de un gel y se establecen las interacciones físicas y químicas necesarias para la formación de un núcleo. Así mismo, se han diseñado estudios con diversos sistemas experimentales para determinar el efecto de macromoléculas, normalmente proteínas de tejidos mineralizados, en la formación de hidroxiapatita *in vitro*.<sup>52, 53</sup>

En el presente estudio se empleó un sistema a base de difusión en gel. Este sistema es comúnmente empleado para evaluar la capacidad nucleadora de cristales usando diversas biomoléculas, debido a que simulan a las características de la matriz de los tejidos mineralizados, además que se tiene un mejor control de la concentración y la naturaleza de los componentes del gel, de la difusión de los iones, y se realizan bajo condiciones similares a las fisiológicas (pH, temperatura y presión) que influyen en la formación y crecimiento del cristal en gel.<sup>54</sup>

Durante muchos años, se ha creído ampliamente que la naturaleza exquisitamente precisa de la formación de cristales en tejidos biológicos es el resultado de interacciones estereoquímicamente específicas entre los cristales en crecimiento y las proteínas de la matriz extracelular. Es decir, la capacidad de muchas proteínas presentes en tejidos mineralizados de adsorberse a caras particulares de los biominerales se ha atribuido a una complementariedad estérica y eléctrica entre regiones periódicas de la cadena de polipéptidos y conjuntos de iones en la cara cristalina.<sup>55</sup>



La teoría clásica sobre la formación de minerales supone que la nucleación y crecimiento cristalino se da por la interacción de elementos esenciales (iones, moléculas) en soluciones sobresaturadas, aunque se pueden dar transformaciones de fases en etapas posteriores. La asociación de elementos en solución para la formación de precursores o unidades de crecimiento (clusters de Calcio y Fósforo, Ca/P) es el primer paso importante. Estos pueden crecer por agregación y dar lugar a un macro-cristal termodinámicamente estable por transformaciones cristalinas amorfas.<sup>51, 55, 56</sup>

Esta teoría indica que los constituyentes pueden unirse en grupos de dos o más para formar dímeros o trímeros, por colisión. Por tanto, la nucleación es la aparición inicial de una nueva fase durante una transición de primer orden (poco estable) en el que los pequeños núcleos, formados espontáneamente en una solución sobresaturada, superan la barrera de nucleación. Se han realizado estudios donde la adición de proteínas intrínsecamente ordenadas, que interactúan con iones Ca/P, promueven la nucleación de cristales de hidroxiapatita. Sin embargo, en los últimos años, se ha acumulado evidencia de que muchas proteínas asociadas a minerales carecen de estructura periódica incluso cuando son adsorbidas a los cristales. También parece que las interacciones proteína-cristal implican una atracción electrostática general en lugar de una serie de cargas complementarias.<sup>56, 57</sup>

Otro planteamiento existente acerca de la interacción de proteínas con caras específicas de cristales es la descrita en la teoría estereoquímica, la cual requiere de la rigidez de la estructura  $\beta$ -laminar,  $\beta$ -hebra o  $\alpha$ -hélice de las proteínas para formar enlaces con el ion de  $\text{Ca}^+$  presente en las caras del cristal. Estudios recientes han mostrado que las interacciones electrostáticas, donde la adsorción de proteínas a cristales se ve favorecida por grupos aniónicos presentes en péptidos o proteínas, no son una regla para todas las proteínas que interactúan de manera estereoquímica con la hidroxiapatita, ya que la falta de plegamiento de las proteínas de unión a minerales facilita su absorción al permitir que los grupos cargados tengan libertad conformacional para formar enlaces electrostáticos con iones  $\text{Ca}^+$  expuestos en la cara del cristal.<sup>51, 55</sup>



De acuerdo a los estudios de Graeme K. Hunter, y colaboradores, sugirieron que las interacciones entre las proteínas que modulan los minerales y los cristales biológicamente relevantes son principalmente de naturaleza electrostática, y que el desorden molecular ayuda a estas proteínas a formar múltiples enlaces con los cationes de la cara cristalina.<sup>55</sup>

La capacidad de las proteínas/péptidos para inducir y/o inhibir la mineralización se atribuye a menudo ya sea sus regiones poli-ácido (poli-glutamato o poli-aspartato) o a sus numerosos residuos de fosfo-serina, ya que les brindan carga negativa. La agrupación de estas cargas negativas sugiere que la alta afinidad de estas proteínas ricas en ácido aspártico hacia minerales ricos en calcio, se deriva de su capacidad para interactuar electrostáticamente con iones de calcio.<sup>56</sup>

La adsorción de estas moléculas ácidas de la matriz extracelular en ciertas caras de un cristal, podrían bloquear la adición de más iones a esa superficie influyendo en el tamaño y crecimiento del cristal. Las proteínas ácidas, que participan en cada uno de estos procesos de cristalización se cree que, pese a su desorganizada estructura secundaria, proporcionan una plantilla capaz de dirigir la formación de fases minerales específicas. Por tanto, el papel que juegan las moléculas en la matriz mineralizante dependerá de las interacciones con los iones calcio del medio durante el crecimiento de la hidroxiapatita, así como también las interacciones con otras moléculas.<sup>4, 58</sup>

En el área odontológica se han realizado trabajos con polipéptidos sintéticos derivados de proteínas de tejidos dentales, como la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1), han mostrado la capacidad de unirse a zonas desmineralizadas en la dentina humana y con el potencial de estabilizar la nucleación a partir de niveles fisiológicos de calcio y fosfato, promoviendo la formación de hidroxiapatita dentro de una matriz de colágena. Además, se han identificado algunos péptidos funcionales derivados de la proteína amelogenina que tienen la capacidad actuar como agentes remineralizantes, y de contribuir en la regeneración del tejido periodontal.<sup>11,17</sup>



Estudios recientes mostraron el efecto de péptidos derivados de CEMP1 (CEMP1-p1 y CEMP1-p3) que 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 hidroxiapatita.<sup>59</sup>

Al evaluar diferentes concentraciones del péptido en la formación de cristales de hidroxiapatita, se observó un incremento en la formación cristalina proporcional a la concentración del péptido; lo que nos sugiere su capacidad de interactuar con iones calcio (Ca<sup>+</sup>).<sup>60</sup>

El análisis *in silico* del péptido CEMP1-p5 empleado en este trabajo permitió identificar grupos funcionales importantes como la presencia de serinas y aminoácidos negativos que en su conjunto le dan un punto isoeléctrico ácido, lo que nos sugiere que podría establecer interacciones electrostáticas entre los grupos funcionales de los aminoácidos y los iones de Ca<sup>+</sup> presentes en las soluciones que permiten su eventual ordenamiento propiciando su crecimiento. Este mecanismo se ha demostrado presente en la amelogenina a través de su dominio en el carboxilo terminal ya que contiene residuos de ácido glutámico, aminoácido negativo involucrado en la biomineralización de hueso.<sup>60, 61</sup>

El ácido glutámico (uno de los aminoácidos identificados en el péptido CEMP1-p5) ha sido reportado con gran relevancia en la relación péptido-cristal, al demostrar su participación en la formación de nano estructuras cristalinas, guiando su crecimiento y dirigiendo la disposición de pequeñas estructuras que eran dependientes de la concentración de dicho aminoácido, permitiendo la orientación cristalina en el plano (001) en forma de cristales hexagonales.<sup>62</sup>

El péptido estudiado contiene 8 aminoácido hidrofílicos distribuidos a lo largo de la cadena peptídica, por lo cual se puede considerar que posee buena solubilidad en agua.



En suspensión acuosa, estos residuos de aminoácidos pueden establecer puentes de hidrogeno inter e intra péptido que, aunado a la presencia de glicina (aminoácido no quiral que debido a su tamaño otorga flexibilidad a las estructuras proteicas y peptídicas,) permitirían el autoensamblaje del péptido, lo que podría favorecer su adsorción hacia la superficie de la hidroxiapatita, interactuando directamente con ciertos iones.

Al incubar el péptido en un gel que sirve como un medio para la difusión controlada de iones, y que por sí mismo no influye en el proceso de mineralización, se observaron formaciones esferoides en todo el gel, cuya composición química es, predominantemente, calcio y fósforo. Dichas estructuras esferoides se conforman de pequeñas agujas fusionadas en láminas que emergen de un núcleo; lo cual nos deja ver que el péptido interactúa con la organización de los iones en los distintos planos cristalinos.

Los depósitos encontrados en ausencia del péptido sólo se localizaron en la interfaz del gel y la solución de difusión, cuya morfología irregular y composición a base de calcio y fósforo nos muestra la formación de una posible fase mineral. Por lo que el péptido CEMP1-p5 participa en la regulación de la morfología y maduración de los cristales.

Al identificar los grupos funcionales presentes en las muestras con el empleo de la espectroscopía infrarroja identificamos las bandas de los modos vibracionales del grupo hidroxilo (OH-) y fosfato (PO<sub>4</sub>); lo que nos permitió demostrar que los depósitos formados se trataban de apatitas, demostrando que el sistema permite la difusión controlada para la organización de celdas cristalinas.

Sin embargo, al realizar la caracterización de los depósitos mediante microscopía electrónica de transmisión, logramos identificar que los cristales formados en presencia del péptido mostraron los planos cristalinos (403), (313), (102) y (212) que al ser comparado con tablas de Cristalografía Internacionales concluimos que se trataban de Hidroxiapatita.

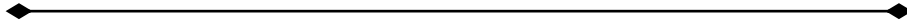


En cuanto a los cristales formados en ausencia del péptido no se pudo realizar el análisis, ya que la muestra sufrió daños químicos y estructurales por el paso del haz de electrones, esto debido a que presentaron pobres características cristalinas, que son observadas en minerales inmaduros.

Si bien, existen técnicas cualitativas y cuantitativas para la caracterización de minerales y compuesto cristalinos, el empleo de diversas tecnologías complementarias permitirá obtener datos más certeros sobre la composición química e incluso ordenamientos atómicos. En este estudio, se emplearon herramientas semicuantitativas como EDS, donde la relación Ca/P no mostro valores estequiométricos ya que la hidroxiapatita no es pura al formarse a partir de la nucleación heterogénea; en la muestra control se observó una relación de 1.3, que son valores característicos de las fases minerales deficientes de calcio, mientras que la muestra experimental dio una relación de 1.75, valor que nos infiere la presencia de apatita con mayor porcentaje de calcio.

Además, la identificación de grupos funcionales mediante la evaluación de sus modos vibracionales y el ordenamiento de los átomos en un plano cristalino, nos permitió obtener una caracterización muy completa de las muestras caracterizadas, teniendo valores positivos a la hidroxiapatita en la muestra experimental.

En la actualidad, sabemos que la saturación de iones, pH, temperatura, y la presencia de macromoléculas como péptidos, proteínas entre otras moléculas, regularán las condiciones bioenergéticas para la nucleación y crecimiento de los minerales que darán como resultado las diversas morfologías cristalinas (esferoides, varilla, fibras, placas, escamas) a escalas micro o nanométricas, las cuales ya han sido ampliamente estudiadas en el área de biomineralización y bioingeniería de tejidos con el objetivo de desarrollar nuevos fármacos o sustitutos óseos que puedan dirigir una dirección de crecimiento cristalino.<sup>61</sup>



## 11. CONCLUSIÓN

El proceso de cristalización de la hidroxiapatita aún no es claro teniendo en cuenta los estudios realizados en el campo, además, los mecanismos moleculares de la interacción de proteína-proteína y proteína-mineral son poco conocidos.

Sin embargo, con todos los datos obtenidos se determinó que el péptido derivado de la proteína del cemento 1 (CEMP1-p5) promueve la formación, crecimiento y morfología de cristales de hidroxiapatita, además de controlar su madurez mineral al ser evaluado en un sistema de gel-sol y comparando los resultados con los cristales obtenidos sin péptido, encontrando diferencias marcadas y obteniendo información novedosa.

A pesar de lo reportado, aún faltan más estudios que permitan elucidar el mecanismo molecular exacto de esta proteína en el proceso de mineralización.





## 12. REFERENCIAS.

1. Carranza FA, Neuman MG. (2012). Clinical periodontology. 11th Edition. Saunders Company. USA.
2. Lindhe J. (2012). Periodontología Clínica e Implantología odontológica: conceptos básicos. 6° Edición. Tomo 1. En: Lang P. Editorial Médica panamericana. España.
3. López A. (2012). Mineralización de los tejidos dentales. LinkedIn Learning Co.
4. Montoya, G. tesis. (2015). Estudio de cristales inducidos con el péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) en un sistema libre de células. Universidad Nacional Autónoma de México DdEdPel.
5. Almaguer A, Villagómez JG. (2018) Ecología Oral. Edit. Manual Moderno. México. Pp 15-20.
6. Pérez A. tesis. (2015). Efecto biológico de un péptido de la proteína del cemento 1 (CEMP1) en el proceso de diferenciación de células derivadas del ligamento periodontal humano. Universidad Nacional Autónoma de México DdEdPel.
7. Pitaru S, Savion N, Hekmati H, Olsen S, Narayanan SA. (1992). Binding of a cementum attachment protein to extracellular matrix components and to dental surfaces. J Periodontal Res. 27(6): 640-6.
8. Bartold PM, Narayanan AS. (2006). Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. Periodontology 2000. 40: 20-49.
9. García-Garduño M, Reyes-Gazca J. (2006). La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 9(2):90-95.
10. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. (2006). Molecular and cell biology of cementum. Periodontol 2000.; 24:73-98.
11. Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. (2015). Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. Periodontol 2000. 67(1): 33-211.
12. Vargas AP, Yáñez BR, Monteagudo CA. (2016). Periodontología e Implantología. Editorial Médica panamericana. México.
13. Montoya G, Arenas J, Romo E, Zeichner-David M, Álvarez M, Narayanan A, Velázquez U, Mercado G, Arzate H. (2014). Human recombinant cementum attachment protein (hrHACD1/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. Bone. 69. 154–164.
14. Delak K, Harcup C, Lakshminarayanan R, Sun Z, Fan Y, Moradian-Oldak J, et al. (2009). The tooth enamel protein, porcine amelogenin, is an intrinsically disordered protein with an extended molecular configuration in the monomeric form. Biochemistry. 48: 2272–81.
15. Romo, E. Tesis. (2014). Caracterización estructural de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y su relación con la función biológica. Universidad Nacional Autónoma de México.
16. Salgado F. Tesis. (2017). Desarrollo de la fase preclínica de fármacos peptídicos derivados de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) y su potencial eficacia en el tratamiento de la osteoporosis. Universidad Nacional Autónoma de México DdEdPel.
17. Padovano J.D, Ravindran S, Snee P.T, Ramachandran A, Bedran-Russo AK, George A. (2015). DMP1- revides Peptides Promotes Remineralization of Human Dentin. Journal of dental Research. 608-614.



18. Azzopardi PV, O'Young J, Lajoie G, Karttunen M, Goldberg HA, Hunter GK. (2010). Roles of electrostatics and conformation in protein-crystal interactions. *PLoS One* 19;5(2).
19. Cai M, Smith E, Holt S. (2015). The role of fetuin-A in mineral trafficking and deposition. *BoneKEy reports 2015*. Figure 1.
20. Beniash E. (2011). Biominerals—hierarchical nanocomposites: the example of bone. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 3:47–69.
21. Nanci, A., and D. D. Bosshardt. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. In *Periodontol 2000*. Denmark.
22. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y, Morita I. (2012). Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*; 227:649–57.
23. Utria A, Reales Y. (2016). Biomecánica del ligamento periodontal. Slideplayer. 2-26.
24. Grzesik WJ, Narayanan AS. (2002). Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13:474–84.
25. Álvarez Pérez MA, Pitaru S, Alvarez Fregoso O, Reyes Gasga J, Arzate H. (2003). Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Struct Biol.* 143(1):1-13.
26. Carmona-Rodríguez B, Alvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, et al. (2007) Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 358: 763–769.
27. Arzate, H. (1992). Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J.* 6(11): p. 2990-5.
28. Correa R. tesis. (2019). Caracterización físico química de un péptido derivado de la proteína del cemento 1 y su aplicación terapéutica in vivo. Universidad Nacional Autónoma de México DdEdPel.
29. Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS. (1996). Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res.* 11(5):686-92.
30. Hernández S. tesis. (2016). Péptido derivado de CAP para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo animal. Universidad Nacional Autónoma de México DdEdPel.
31. Nuñez J, Sanz M, Hoz-Rodríguez L, Zeichner-David M, Arzate H (2010) Human cementoblasts express enamel-associated molecules in vitro and in vivo. *J Periodontal Res* 45: 809–814.
32. Arzate H, Jiménez-García LF, Alvarez-Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. (2002). Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res.* 81(8):541-6.
33. He G, Dahl T, Veis A, George A. (2003). Dentin matrix protein 1 initiates hydroxyapatite formation in vitro. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1, 240-245.
34. Dellavia C, Canciani E, Rasperini G, Pagni G, Malvezzi M, Pellegrini G. (2019). CEMP-1 Levels in Periodontal Wound Fluid during the Early Phase of Healing: Prospective Clinical Trial. *Mediators Inflamm.* Vol. 2019; 8 pages.
35. Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS. (1992). Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J.* Aug;6(11):2990-5.



36. Serrano J, Romo E, Bermúdez S, Narayanan AS, Zeichner-David M, Santos L, Arzate H. (2013). Bone Regeneration in Rat Cranium Critical-Size Defects Induced by Cementum Protein 1 (CEMP1). *Plos One*. Vol. 8. 10 pages.
37. Romo-Arévalo E, Arzate H, Montoya-Ayala G, and Rodríguez Romero A, (2016). High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum protein 1 whit lectin activity. *FEBS let*. 590, 129-138.
38. Soria, A. tesis. (2015). Efecto biológico de un péptido de la proteína del cemento 1 (CEMP1) en el proceso de diferenciación de células derivadas del ligamento periodontal humano. Universidad Nacional Autónoma de México DdEdPel.
39. Arpel A et al. (2014). Transmembrane Domain Targeting Peptide Antagonizing ErbB2/Neu Inhibits Breast Tumor Growth and Metastasis. *Cell Reports*. Volume 8, Is. 6. Pp 1714-1721.
40. López, K. tesis. (2018). Papel de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) en la formación y crecimiento de oxalato de calcio e hidroxapatita. Universidad Nacional Autónoma de México DdEdPel.
41. Janairo, J. (2016). Peptide-Mediated biomineralization. *Springer Briefs in Materials*: Singapore. P. 72.
42. González R. tesis. (2012). Síntesis y caracterización de nanocristales de hidroxapatita obtenidos por el método de sol-gel. Universidad Nacional Autónoma de México DdEdPel.
43. Sadat M, Khorasani M, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia* 9: 7521-621.
44. Jia F, Zhao D, Wang M. (2016). Selective nucleation and self-organized crystallization. *Progress in crystal growth and characterization of materials*. 62 (2): p. 252-272.
45. González R., Pareja R., Ballesteros C. (1991). *Microscopía electrónica*. Eudema. Madrid, España.
46. Jenkins, D., Richard, M. G. y Daigger, G. T. (2004). *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. Lewis Publishers.
47. Labrada, G; Peña, Al. (2017). *Microscopios electrónicos de barrido*. linan-ipicyt.mx.
48. Monroy, O. tesis. (2010). Succinatos de cinc y cadmio como adsorbentes de moléculas pequeñas. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.
49. Zavala, E. tesis. (2003). Enseñanza experimental en Espectroscopia Infrarroja. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
50. Sear, R.P. (2014). Quantitative studies of crystal nucleation at constant supersaturation: experimental data and models. *CrystEngComm*. 16(29): p. 6506-6522.
51. Mann, S.; Archibald, D. D.; Didymus, J. M.; Douglas, T.; Heywood, B. R.; Meldrum, F. C.; Reeves, N. J. *Science* 1993, 261, 1286–1292.
52. Gorski, JP (1992). Acidic phosphoproteins from bone matrix: a structural rationalization of their role in biomineralization. *Calcif Tissue Int* 50, 391-396.
53. Schlesinger DH, and Hay DI. (1986). Complete covalent structure of a proline-rich phosphoprotein, PRP-2, an inhibitor of calcium phosphate crystal growth from human parotid saliva. *Int J Pept Protein Res* 27, 373-379.
54. García-Ruiz JM. (2003). Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Methods Enzymol*; 368:130-54.



55. Hunter GK, O'Young J, Grohe B, Karttunen M, Goldberg HA. (2010). The flexible polyelectrolyte hypothesis of protein-biomineral interaction. *Langmuir*. Dec 21;26(24):18639-46.
56. Addadi L and Weiner S. (1985). Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proc Natl Acad Sci. USA* 82, 4110-4114.
57. De Yoreo JJ and Vekilov PG. (2003). Principles of Crystal Nucleation and Growth. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry* 54, 57-93.
58. Tye CE, Rattray KR, Warner KJ, Gordon JA, Sodek J, Hunter GK and Goldberg HA. (2003). Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. *J Biol Chem* 278, 7949-7955
59. Guangyoun Z, Vian Z, Qi F, Xueliang W. (2011). Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*; 1187-1195.
60. Romo-Arévalo, E. et al. (2009). 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.
61. Wojtas M, Dobryczycki P, Ożyhar A. (2012). Intrinsically disordered proteins in biomineralization. *Advanced topics in biomineralization*.
62. Rivera E, Velázquez R, Alonso S, Alanís R. (2018). HAp Nanofibers growth with crystalline preferential orientations and its influence in mechanical properties of organic-inorganic composite materials. *Advances in Composite Nanomaterials, Biomedical Applications and Its Technological Facets*; Chapter 3