



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EFFECTO DE UN FOSFOPÉPTIDO DERIVADO DE
LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO
RADICULAR (HACD1/CAP) SOBRE LA
FORMACIÓN Y CRECIMIENTO DE CRISTALES DE
OXALATO DE CALCIO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A:

MARGARITA PIÑON MANUEL

TUTOR: Dr. GONZALO MONTOYA AYALA



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 INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por mi educación, por sus instalaciones en donde adquirí el conocimiento y habilidad de mi profesión, así como a su personal académico que con paciencia y dedicación me han sostenido hasta hoy.

*Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT-UNAM, con clave **IN204120**) por el apoyo otorgado para el desarrollo de este trabajo de tesis.*

A los miembros del laboratorio de Biología Periodontal de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM.

Al Dr. Samuel Tehuacanero Cuapa por su tiempo y apoyo durante el análisis de microscopía electrónica de barrido, realizadas en el Laboratorio Central de Microscopía del Instituto de Física, UNAM.

A la Dra. Karina Jiménez Duran del Laboratorio de Microscopía Confocal de la USAII, Facultad de Química, UNAM, por su apoyo en la obtención y análisis de las imágenes de microscopía confocal.

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

Al Dr. Gonzalo Montoya Ayala, por aceptar ser mi tutor en este trabajo, por su paciencia, apoyo, compromiso, por compartir siempre sus conocimientos, pero sobre todo por ser un excelente profesional y ser un gran ejemplo.

A la Dra. Santa Rita Arroyo Cruz, a la Dra. Adriana Pérez Soria, al Dr. Luis Fernando Jacinto Alemán por sus valiosas aportaciones para la mejora de este trabajo.

A los profesores que me guiaron en toda la carrera y me brindaron sus conocimientos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, que me han apoyado incondicionalmente, por su amor, su comprensión, por todo su esfuerzo, por cada uno de sus consejos. Gracias a ustedes he logrado cumplir cada una de mis metas. Por todo lo que me han enseñado en la vida.

A Alejandro que cada día me brindas lo mejor de ti, por ser una gran persona, por tu apoyo y tu comprensión. Por estar en mis momentos más felices, pero también en los más tristes o difíciles. No sabes lo importante que es en mi vida contar con alguien como tú, que me ayude a mejorar cada día con tus consejos que son irremplazables, gracias por compartir tu tiempo. Tú y Luffy hacen más feliz mi vida.

A mis hermanos, a Daniel que a pesar de todo me has apoyado en muchos aspectos y aun con nuestras diferencias también me brindas tu cariño, a Alfredo por tus consejos.

A mi Abue, por su cariño y su interés, por todos los días que se preocupa por mi bienestar.

A mis Primos, Marisol, Carlos, Wendy por todo el cariño, por su apoyo para continuar en mi desarrollo profesional, gracias Marisol por toda tu paciencia, por cada día que te preocupas por mí y me demuestras tu cariño, por hacerme saber que también eres mi amiga.

A Tere que en estos últimos años juntas me demostraste una amistad sincera, por tu ayuda tanto académica como personal, por tu tiempo, tu afecto y por estar en momentos buenos y malos. Siempre mejoraste mis días tanto en la clínica como en el servicio.

A mis amigos, a Daniel que aun con las diferencias siempre me brindaste tu ayuda y estuviste en momentos muy difíciles, a Brenda por toda tu ayuda durante toda la carrera, por los momentos buenos, a Diana por tu apoyo y tus consejos. Gracias por su amistad y por cada material que me brindaron.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Biom mineralización	3
Minerales de origen patológico.....	6
Periodonto y Cemento Radicular.....	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	13
HIPOTESIS.....	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
METODOLOGÍA.....	16
Síntesis del péptido	16
Ensayos de cristalización	17
Caracterización de los cristales.....	17
Marcaje con Alexa Flúor.....	17
Ensayo de adsorción en cristales de oxalato de calcio	18
RESULTADOS.....	19
Caracterización fisicoquímica del péptido fosforilado.....	19
Efecto del péptido fosforilado sobre la formación de cristales de oxalato de calcio	20
Adsorción del péptido fosforilado en cristales de oxalato de calcio.....	23
DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIÓN.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30

RESUMEN

Las calcificaciones ectópicas o litos renales se producen por la retención y deposición de sales debido a la alteración del proceso de biomineralización. La formación de estos cálculos se consideran un fenómeno crónico multifactorial con una prevalencia cada vez mayor a nivel mundial. El oxalato de calcio es el biomineral representativo de calcificaciones renales, ateromas y se asocia al cálculo dental. Se sabe que estos depósitos de calcio precipitan debido a altas concentraciones de iones que dan lugar a morfologías con un hábito de crecimiento característico que promueve la formación de agregados policristalinos que pueden causar un daño tisular.

Se han identificado moléculas aniónicas con la capacidad de inhibir la formación y crecimiento de calcificaciones patológicas, ya sea incrementando el pH, formando complejos con iones calcio o adsorbiéndose a caras de crecimiento cristalino. Hoy en día, se sabe que la presencia de aminoácidos ácidos y/o con residuos fosforilados dentro de la secuencia de proteínas reguladoras del proceso de biomineralización, es una alternativa en la prevención y tratamiento de calcificaciones patológicas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la presencia de fosfoserinas en una secuencia aminoacídica derivada de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP), sobre la formación y crecimiento de cristales de oxalato de calcio. El estudio se realizó mediante ensayos de cristalización de oxalato de calcio en presencia del péptido fosforilado y la caracterización se llevó a cabo con ayuda de microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y con microscopía de fluorescencia.

Los resultados obtenidos muestran que la secuencia peptídica con tres residuos fosforilados tiene la capacidad de adsorberse a caras específicas de cristales de oxalato de calcio e inhibe su formación y crecimiento.

INTRODUCCIÓN

En sistemas biológicos, la formación y crecimiento de minerales depende de condiciones extracelulares: como la concentración de los iones, temperatura, pH, y la presencia de moléculas orgánicas como proteínas (1,2,3). Se cree que el mecanismo por el cual las proteínas participan en la formación y crecimiento de estos cristales se debe a la interacción de pequeñas secuencias de aminoácidos (péptidos) con los iones calcio, e incluso pueden estimular o inhibir numerosas funciones celulares (1-10).

Investigaciones recientes se han enfocado en el estudio de minerales ectópicos (patológicos) que se forman en tejidos no mineralizados y que se han relacionado con elevadas concentraciones de iones en regiones de baja fluencia de líquidos. Dichos depósitos están formados principalmente por fases minerales como apatitas, oxalato de calcio, carbonatos, entre otros. El oxalato de calcio, es un mineral que ha tomado gran relevancia en las investigaciones médicas, debido a que es el mineral representativo de calcificaciones en el riñón, arterioesclerosis e incluso en el cálculo dental. Diversos estudios han descrito la participación de secuencias peptídicas con la presencia de ciertos aminoácidos específicos (aspartato, glutamato y serina) que han demostrado su capacidad de inhibir la precipitación de minerales. Investigaciones realizadas con secuencias peptídicas modificadas han demostrado que la presencia de fosforilaciones en residuos aminoacídicos podría potencializar su efecto inhibitor (11, 12,13).

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, identificamos una secuencia (con la presencia de serinas, aspartato y glutamato) derivada de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) con la capacidad de inhibir la formación y crecimiento de biominerales de importancia biológica (14). Por lo anterior, en este proyecto evaluamos si la presencia de fosfatos en serinas incrementa la capacidad inhibitoria del péptido derivado de HACD1/CAP en la formación y crecimiento de cristales de oxalato de calcio.

MARCO TEÓRICO

Biomíneralización

Biomíneralización se refiere al proceso mediante el cual los organismos vivos producen minerales (1,2). Un mineral es un compuesto de naturaleza inorgánica que puede tener una estructura cristalina. En este proceso los organismos dirigen la formación y ubicación de biomínerales usando moléculas biológicas específicas, adaptadas para controlar la nucleación, el crecimiento y la morfología de los cristales. El crecimiento de un cristal comienza con la nucleación, que es el proceso por el cual se produce la agregación de iones en fase para formar una celda unitaria, a partir de la cual se forman cristales con patrones de crecimiento específico (1, 3, 4, 5).

La nucleación se puede dar en dos modos:

- Nucleación homogénea donde intervienen los iones que forman la fase mineral. Generalmente se da en disoluciones saturadas y sobresaturadas que necesitan de condiciones supra-fisiológicas para que puedan llevarse a cabo (15,16).
- Nucleación heterogénea en donde además de los iones que forman el cristal, actúan moléculas de diferente naturaleza con la capacidad de modular o acelerar el proceso de nucleación. Este proceso se da en los seres vivos, en el cual participan proteínas para formar los diferentes biomínerales como lo son, el carbonato de calcio en los exoesqueletos de los moluscos o la hidroxiapatita en los huesos de vertebrados. Los minerales que se forman en seres vivos tienen diferencias en tamaño, forma y cristalinidad a los abióticamente formados (1, 15, 16).

El crecimiento de los cristales comenzará a partir de los núcleos, siempre que las condiciones del medio como son tiempo, temperatura, pH, estabilidad termodinámica sean propicias. Las caras de crecimiento cristalino son disposiciones que se encuentran alrededor del núcleo, en las cuales es más fácil la adición de nuevos iones. En disolución los iones tienden a llenar huecos, completar caras y formar nuevas caras de crecimiento cristalino, pero la cristalización es imperfecta debido a que como en cualquier proceso natural, se producen defectos en el crecimiento que son causantes de variaciones en el color o la forma de los cristales (17, 18, 19).

En los humanos el proceso de biomineralización se lleva a cabo en los osteoblastos, odontoblastos, cementoblastos y condroblastos que son células que producen los tejidos mineralizados de los huesos y dientes. En estas células los componentes que favorecen la biomineralización se concentran en vesículas de biomineralización, las cuales se forman a partir de la membrana plasmática de la célula osteogénica por la acción de GTPasas como Rac (Enzima pequeña de hidrólisis de GTP), Rho, CD42 (Glicoproteína Ib) o ARF6 (Factor ADP-ribosilación 6), que son proteínas que regulan los arreglos corticales de la actina del citoesqueleto. La bicapa lipídica de las vesículas de biomineralización además de colesterol y esfingomielina posee, una gran cantidad de lípidos de carga negativa que sirven como puntos de atracción para el catión calcio durante la mineralización. En la superficie de las vesículas de biomineralización se encuentra una alta concentración de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) y adenosina monofosfatasa (AMPasa), estas al hidrolizar adenosin monofosfato (AMP) aumentan la concentración de grupos fosfato dentro de la vesícula. El AMP que se encuentra en las vesículas de biomineralización es debido a la hidrólisis de ATP que llevan a cabo las ATPasas, otro producto de esta hidrólisis es el pirofosfato (PPi), inhibidor de la formación de minerales.

El efecto del pirofosfato es inhibido por la pirofosfatasa inorgánica (Ppiasa) que lo hidroliza para agregarlo en el mineral que se encuentra formándose (20, 21). Las vesículas de biomineralización también cuentan con abundantes anexinas como la V, que actúa como canal de transporte de cationes calcio que ayudan al proceso de mineralización, mientras que las anexinas II y VI participan en formación de la vesícula regulando la actina cortical del citoesqueleto. (23).

La mineralización en las vesículas comprende de dos fases. En la primera fase, este proceso es regulado por enzimas, proteínas y fosfolípidos de la membrana vesicular. Esta fase inicia cuando la carga negativa de los fosfolípidos en la membrana atrae el catión calcio, después proteínas afines a Ca^{2+} (anexina V), ingresan el catión al interior de la vesícula. Posteriormente ALP, PPIasa y AMPasa actúan sobre esterios de fosfato para generar un aumento de iones fosfato (PO_4^{3-}). El incremento de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} da como resultado precipitados amorfos no cristalinos, precursores que darán lugar a una apatita menos soluble (21, 22).

La segunda fase comienza cuando los cristales previamente formados de apatita, se exponen hacia los fluidos extracelulares, donde se propagan acumulándose en estructuras esféricas. Después, los cristales entran en contacto con las fibras de colágena de la matriz extracelular. De esta manera, la colágena es sumamente importante en la nucleación y orientación de los cristales de apatita al actuar como un andamio. La interacción entre los cristales esféricos en suspensión y las fibras de colágena es facilitada por las proteínas de la matriz que permiten la maduración del mineral (22, 24).

Durante la biomineralización existen factores que afectan el proceso, siendo el pH el de mayor trascendencia en los sistemas biológicos. Las vesículas de biomineralización, contienen en su interior una alta concentración de la enzima anhidrasa carbónica II que al eliminar protones que se acumulan como un subproducto de la formación de hidroxiapatita controlan el pH intravesicular y como resultado se evita la solubilidad del mineral recién formado. (24)

Minerales de origen patológico

El calcio es el componente catiónico más importante en la formación y crecimiento de los tejidos mineralizados; sin embargo, también se ha encontrado formando parte de depósitos minerales ectópicos también denominados litos, como es el caso del oxalato de calcio (presente en calcificaciones renales, arterioesclerosis y cálculo dental) y carbonato de calcio (como aragonito o calcita) withlokita y brushita los cuales se localizan en cálculo dental (25). Estos litos se producen a partir de una retención y deposición de sales debido a la alteración del proceso de biomineralización, cuando los cálculos son muy grandes pueden causar obstrucción dando lugar a manifestaciones clínicas agudas y a complicaciones posteriores relacionadas con la patología que implican visitas de emergencia, diagnóstico y tratamiento médico/quirúrgico. Los cálculos renales pueden desarrollarse en cualquier individuo; sin embargo, son más frecuentes en hombres (1.3 por cada mujer) entre los 25 y 50 años de edad. Los datos epidemiológicos en México son escasos debido a la falta de registros de este padecimiento en los centros de salud y por la propia naturaleza de la enfermedad, por lo que la fuente más empleada son los registros de atención hospitalaria, donde se ha reportado que su prevalencia se puede duplicar en pacientes con síndrome metabólico.

En la litiasis renal, los cálculos más frecuentes son los de calcio con una prevalencia del 60-65% y se forman debido a saturación renal que lleva a la nucleación y crecimiento de cristales de oxalato o fosfato de calcio. La fisiopatología de la litiasis urinaria incluye volumen urinario bajo, hipercalciuria, alteraciones en el pH urinario que provoca hipersaturación de iones, principalmente un alto contenido de oxalato ($C_2O_4^{2-}$) (26, 27). Los cristales de oxalato de calcio pueden estar presentes en su forma dihidratada (COD, que es más soluble), y en forma de oxalato de calcio monohidratado (COM). Los cristales COM, gracias a su hábito de crecimiento y características morfológicas, poseen mayor tendencia a adherirse a las células epiteliales de los túbulos mediante interacciones electrostáticas lo que ocasionan la agregación de más depósitos policristalinos y la eventual lesión de los tejidos (28).

En estudios realizados por Taller y Grohe (2007), mediante el análisis con microscopía electrónica de transmisión, determinaron el hábito de crecimiento de los cristales de oxalato de calcio a través de las orientaciones cristalinas y las relacionaron con las imágenes de microscopía de barrido, de tal manera que fuera posible distinguir las caras de crecimiento $\{100\}$, $\{010\}$ y $\{121\}$ características de los cristales de oxalato de calcio monohidratado (Figura 1).

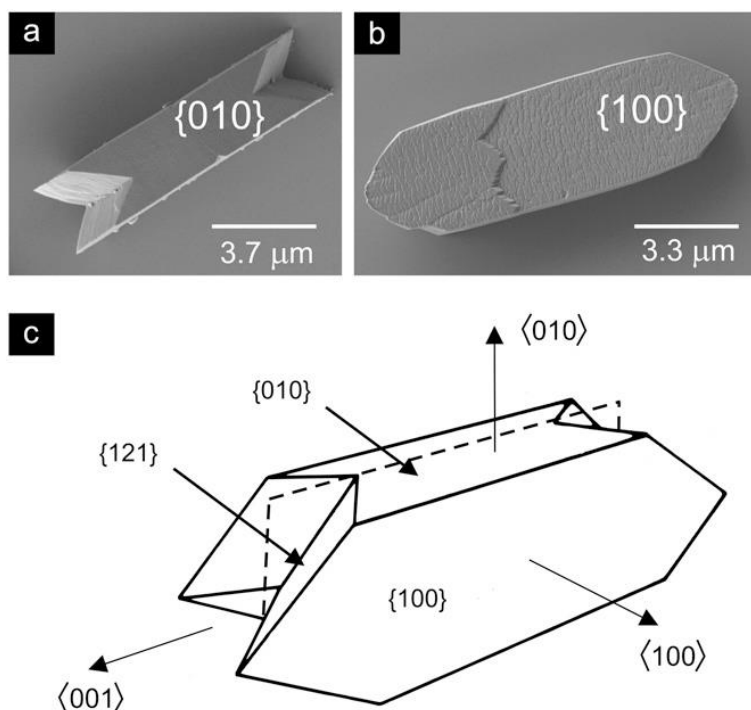


Figura 1. Hábito de crecimiento de COM. a) Micrografía electrónica de barrido de cristal COM visto desde una dirección $\langle 010 \rangle$. b) Micrografía electrónica de barrido de cristal COM $\langle 100 \rangle$. c) Vista en perspectiva del cristal COM, con caras de cristal desarrolladas $\{100\}$ $\{010\}$ y $\{121\}$ e indicaciones de los planos cristalinicos $\langle 100 \rangle$, $\langle 010 \rangle$ y $\langle 001 \rangle$. Las líneas punteadas indican un plano cristalográfico gemelo.

Diversas investigaciones, han identificado y estudiado moléculas aniónicas con la capacidad de adsorberse sobre superficies cristalinas, disminuyendo la adherencia de los cristales en la superficie de células epiteliales, tal es el caso del citrato. Además, se ha descrito la participación de moléculas orgánicas inhibitoras de la formación de cristales como la urimodulina, la nefrocalcina, la osteopontina y la proteína de la matriz Gla. Como resultado de estos trabajos, se ha descrito que dichas moléculas reguladoras pueden actuar mediante la elevación del pH; formando complejos con el calcio reduciendo su concentración iónica; o inhibiendo la nucleación, crecimiento y agregación de los cristales COM. (29-31)

A partir del estudio de proteínas que tienen la capacidad de regular el proceso de biomineralización, se han logrado identificar secuencias que pueden inhibir la nucleación, crecimiento e incluso pueden modificar la morfología y madurez de cristales de oxalato de calcio. Estudios con péptidos derivados de la proteína osteopontina, de la proteína de la matriz Gla, o de proteínas presentes en la saliva como la estaterina, y la histatina, han demostrado una participación activa en la regulación del proceso de biomineralización (29-32). Actualmente, los péptidos con actividad biológica constituyen una novedosa alternativa terapéutica, pues debido a su tamaño son más estables químicamente y pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación, logrando ejercer efectos tanto a nivel local como a nivel sistémico. Además, se pueden sintetizar a grandes cantidades y el costo de producción es mucho menor comparado con las proteínas. Asimismo, se han realizado modificaciones en residuos aminoacídicos específicos que permiten potencializar la actividad biológica, tal es el caso de glicosilaciones o fosforilaciones que han demostrado mayor capacidad de quelar iones calcio, favoreciendo la inhibición del crecimiento cristalino. (33-35)

Para la caracterización y estudio de los minerales se emplean distintas estrategias metodológicas que con el avance de la tecnología nos permiten obtener información muy precisa, tal es el caso de la microscopía electrónica de barrido, la cual nos brinda imágenes de la morfología y homogeneidad química de los cristales, así como las irregularidades estructurales (36).

La microscopía de fluorescencia permite determinar la presencia de moléculas fluorescentes y obtener un análisis cuantitativo del mismo presente o adsorbido sobre la estructura de una superficie (37,38). Siendo el microscopio confocal, una variante de la fluorescencia, nos brinda mayor nitidez y gracias al empleo de un rayo láser permite obtener un barrido de todos los puntos del plano focal, logrando la reconstrucción tridimensional de la muestra. (37, 38, 39).

Periodonto y Cemento Radicular

El periodonto es una unidad funcional que se localiza alrededor del diente, y está conformado por los siguientes tejidos: encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar, siendo el cemento radicular un tejido trascendente en el desarrollo de este trabajo (40).

El cemento radicular es un tejido conectivo mineralizado que cubre la superficie de la dentina en la porción radicular y la conecta con el ligamento periodontal al hueso alveolar. La matriz extracelular del cemento radicular es similar a la de otros tejidos mineralizados como el hueso o la dentina; sin embargo, posee características únicas como la ausencia de inervación, vascularización y drenaje linfático; y a diferencia del hueso no sufre un proceso de remodelación, pero crece por aposición, formando láminas concéntricas alrededor de la raíz del diente (40, 41).

Este tejido permite el anclaje del diente a través de las fibras de Sharpey provenientes del ligamento periodontal. La matriz extracelular del cemento presenta entre 46% a 50% de materia inorgánica (hidroxiapatita y oligoelementos como el flúor, sodio, potasio, hierro, magnesio y azufre), un 22% de materia orgánica y un 32% de agua. El componente orgánico consiste de colágena tipo I y II, fibronectina, osteopontina, sialoproteína ósea, osteocalcina, vitronectina y factores de crecimiento como el factor de

crecimiento transformante beta (TGF- β) y la proteína morfogénica ósea tipo 2 (BMP-2). (40, 42, 43, 44, 45). El cemento radicular presenta dos moléculas polipeptídicas características: la proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP) y la proteína del cemento 1 (CEMP1) (46).

La proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP) se encuentra codificada en el gen que se localiza en el cromosoma 10p13-p14. Esta proteína se encuentra formada por 140 aminoácidos y se sabe que es una isoforma trunca de 3-hidroxiacil-CoA deshidratasa 1; siendo los últimos 15 aminoácidos la diferencia entre ambas isoformas. HACD1/CAP fue la primera proteína aislada del cemento radicular; se expresa en cementoblastos, en células del folículo dental promoviendo su adhesión y diferenciación, y en algunas poblaciones de células del ligamento periodontal. Se ha determinado que participa en el reclutamiento y la diferenciación celular durante la formación de cemento (46-51). HACD1/CAP tiene la capacidad de unirse fuertemente a la hidroxiapatita y promueve la formación de cristales de hidroxiapatita en sistemas de contradifusión *in vitro* (51). Bajo el análisis de dicroísmo circular, la estructura secundaria de HACD1/CAP se compone principalmente de estructura α -hélice y espiral aleatoria. HACD1/CAP forma estructuras proteicas casi esféricas en escala nanométrica (4.8 nm) que forman a su vez, agregados organizados (36, 54).

Diversos estudios han demostrado que la proteína HACD1/CAP promueve la migración y proliferación de células del ligamento periodontal, así como de células óseas; además, induce la formación de tejido mineralizado en un modelo de defecto de tamaño crítico *in vivo* (36, 48), probablemente por la inducción de la neovascularización y el posterior reclutamiento de células troncales mesenquimales, ya que esta proteína se ha demostrado que se expresa por las células troncales paravasculares en el ligamento periodontal,

y estas células son las progenitoras de los osteoblastos y cementoblastos (51, 52, 53, 54).

Recientemente, en nuestro laboratorio se ha identificado una secuencia peptídica de 14 aminoácidos (CAlPi) con carácter ácido, el péptido posee 4 aminoácidos de carga negativa en pH fisiológico, lo que le brindan una carga parcial negativa con la capacidad de quelar iones calcio. Esta secuencia demostró la capacidad de inhibir la formación y crecimiento de cristales, tanto de hidroxiapatita como de oxalato de calcio. Además, posee residuos de serina con el posible potencial de adquirir fosforilaciones y potenciar su efecto.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La formación de minerales ectópicos o patológicos, cada vez es más común entre la población; por ejemplo, la litiasis renal tiene una prevalencia alrededor del mundo entre el 2 y 20%, y el factor de riesgo a padecerlo es de 2-5%; sin embargo, las cifras pueden variar debido a diferentes factores como el género, la edad, trastornos metabólicos, entre otros. Si bien existen tratamientos invasivos con el objetivo de extraerlos o eliminarlos, aún no es clara la etiología y la fisiopatología de estas calcificaciones. El principal reto de las terapéuticas actuales es la prevención de la maduración de dichas calcificaciones, por lo cual, es de gran importancia entender el mecanismo de formación y maduración de los biominerales, lo que permitirá identificar o diseñar moléculas cuya acción sea regular el proceso de mineralización.

Recientemente, se han vuelto comunes los estudios basados en proteínas presentes en células o en fluidos del cuerpo, con la capacidad de modular el crecimiento de cristales, y que puedan ser consideradas como posibles agentes terapéuticos. Los péptidos biofuncionales son en su mayoría fragmentos derivados de estas macromoléculas, y que podrían estar implicados de manera activa en la mediación de la formación de biominerales. La diversidad estructural de los péptidos y su alto nivel de selectividad, los posicionan como candidatos para el desarrollo terapéutico. Para este fin, es necesario sintetizar péptidos bajo condiciones de laboratorio controladas utilizando reacciones químicas altamente eficientes. Aunque muchas investigaciones se han dedicado a la aplicación de péptidos relacionados con la mineralización, hay poca evidencia acerca del empleo de péptidos naturales.

En este trabajo se plantea el uso de una secuencia peptídica derivada de la HACD1/CAP, que ha mostrado su capacidad de inhibir la formación y crecimiento de cristales de importancia biológica, la cual ha sido modificada al reemplazar las serinas por fosfoserinas para evaluar el efecto de dicha secuencia en la inhibición de cristales de oxalato de calcio. Esta secuencia fosforilada la nombramos como CAP-3p, con fines de evitar confusión de la secuencia original. Los nuevos conocimientos obtenidos a partir de este estudio permitirán entender los mecanismos moleculares mediante los cuales el péptido puede llevar a cabo sus funciones y la importancia de las fosforilaciones en la inhibición de calcificaciones ectópicas, permitiendo generar novedosas alternativas en la prevención o tratamiento de dichas patologías.

HIPÓTESIS

De acuerdo a las propiedades fisicoquímicas de la secuencia aminoacídica modificada, el péptido fosforilado CAP-3p tendrá la capacidad de inhibir la formación y crecimiento de cristales de oxalato de calcio en un sistema libre de células.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del péptido fosforilado CAP-3p en la formación y crecimiento de oxalato de calcio en un sistema libre de células.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto del péptido fosforilado CAP-3p sobre la formación y crecimiento de cristales de oxalato de calcio, mediante microscopía de luz y electrónica de barrido.
2. Evaluar el efecto del péptido fosforilado CAP-3p sobre la adsorción de cristales de oxalato de calcio mediante microscopía confocal.

METODOLOGÍA.

Estudio experimental, prospectivo y longitudinal.

Variables independientes	Variables dependientes	Variable	Escala
Presencia o ausencia del péptido Temperatura Supersaturación de iones pH fisiológico	Formación de cristales de oxalato de calcio Crecimiento de cristales de oxalato de calcio	Continua	Razón

Síntesis del péptido

El péptido sintético se seleccionó de acuerdo a lo descrito en estudios previos. Brevemente, a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína HACD1/CAP, tomando en consideración propiedades fisicoquímicas como hidrofobicidad empleando tres programas diferentes: HMMTOP, TMHMM, TMpred; donde se obtuvieron secuencias consenso relacionadas con el proceso de biomineralización. El péptido seleccionado se sintetizó por el método FMOC/tBu mediante la técnica de fase sólida con el reemplazo de serinas por fosfoserinas (se solicitó la producción comercial del mismo a Invitrogen, Carlsbad, USA).

Se determinaron las características fisicoquímicas y el punto isoeléctrico del péptido de manera virtual. El valor de pI se calculó utilizando los softwares Scansite y ExPasy.

Ensayos de cristalización

Para la precipitación de oxalato de calcio, se empleó el protocolo modificado de Grohe (2007), donde se emplean dos soluciones de precipitado, una solución de nitrato de calcio 1 mM, y la otra solución con oxalato de sodio 1mM, acetato de sodio 10 mM y cloruro de sodio 150 mM. De esas soluciones se tomaron 250 μ l y se agregaron a pozos de caja de cultivo (24 pozos) con un disco de mica previamente lavado con acetona, isopropanol y agua desionizada; se colocaron distintas concentraciones del péptido CAP-3p (0.5, 1 y 10 μ g) en cada pozo, y al final se agregó agua desionizada para alcanzar un volumen total de 1 mL. Los discos con las soluciones se incubaron en una estufa de cultivo a 37°C durante 30 min, posteriormente se lavaron con agua desionizada y se desecaron a temperatura ambiente hasta su análisis con microscopía electrónica.

Caracterización de los cristales

La morfología y microestructura de los minerales precipitados de *novo* se analizaron con microscopía de luz y con el microscopio electrónico JSM-7800F Schottky Field Emission. Mediante microscopía electrónica de barrido se identificaron las caras de crecimiento características de los cristales de oxalato de calcio, tomando como referencia los hábitos de crecimiento cristalográfico reportados en la literatura.

Marcaje con Alexa Flúor

Se marcó el péptido fosforilado con 5 μ l de AlexaFlúor-546 en su extremo carboxilo terminal, empleando dimetilformamida en 200 μ L de buffer PBS (2.5 mg/mL) y carbonato de sodio 1 M a pH 8.3. La solución se incubó por 1 hora a temperatura ambiente; el péptido no marcado se removió mediante diálisis en buffer de TBS pH 7.4.

Ensayo de adsorción en cristales de oxalato de calcio

Se sintetizaron cristales de oxalato de calcio empleando la metodología previamente descrita. Se tomaron 200µl de cada una de las soluciones de precipitación de oxalato de calcio en cajas de Petri con fondo de vidrio, se incubaron a temperatura ambiente por 3 hr hasta obtener la formación de depósitos cristalinos; una vez formados, se agregaron 20 µl del péptido previamente marcado con AlexaFlúor-546 (1 µg/mL). Se tomaron fotografías con un microscopio confocal Olympus FV1000, y se realizó la cinética de adsorción adquiriendo las imágenes cada 10 min durante 1 hora.

Las imágenes se importaron a Photoshop 7.0 (Adobe, San José, CA) y las imágenes del canal rojo se analizaron en el software ImageJ.

La intensidad de fluorescencia se midió a lo largo de las líneas correspondientes a cada cara de cristal, restando la intensidad de fondo. La medición comenzó en el vértice entre una cara {100} y una cara {121} y se continuó con las demás caras siguiendo las manecillas del reloj. Los datos resultantes se transfirieron a Excel y se usaron para trazar el gráfico de intensidad de fluorescencia relativa para cada segmento de tiempo.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se reportan como el promedio \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 de Tukey realizando comparaciones múltiples entre los grupos. Se utilizó el paquete estadístico PRISM 8 y un valor de $p < 0.05$ indicó diferencia significativa.

RESULTADOS

Caracterización fisicoquímica del péptido fosforilado

Las características fisicoquímicas del péptido fueron calculadas de manera virtual a través de ExPasy, Scansite y se resumen en el cuadro 1, además se compararon los datos del péptido sin fosforilaciones.

Péptido	MASSDEDGTNGGAS¹	MASpSpDEDGTNGGASp²
Numero de aminoácidos	14	14
Peso Molecular (gr/mol)	1298.4	1532.3
Aminoácidos fosforilados	Ninguno	Sp3, Sp4, Sp14
Punto isoeléctrico (pI)	3.49	1.8

Cuadro 1. Características fisicoquímicas del péptido sin modificaciones (1) y del péptido fosforilado (2)

El péptido que se empleó es una secuencia de 14 aminoácidos, la cual se cambiaron los residuos de serina por fosfoserinas. La presencia de las 3 fosforilaciones incrementa el peso molecular de la secuencia original de 1.3 kDa a 1.5 kDa, sin embargo, este cambio no es capaz de inducir una respuesta inmune ya que se ha reportado que para que un antígeno pueda inducir dicha respuesta requiere de por lo menos 8 KDa. El péptido presenta tres fosforilaciones ubicadas en ser 3, ser 4, ser 14 flanqueando la secuencia aminoacídica; estas fosforilaciones incrementan el carácter ácido del péptido, ya que disminuye el punto isoeléctrico teórico de 3.49 a 1.8; dichos parámetros nos indican que a pH fisiológico los grupos funcionales que componen al

péptido podrán desprotonarse adquiriendo una carga negativa, permitiendo su posible interacción con cationes como el Ca^{2+} .

Efecto del péptido fosforilado sobre la formación de cristales de oxalato de calcio.

Mediante microscopía de luz, se realizó el análisis de los cristales de oxalato de calcio formados en ausencia del péptido, donde se observan precipitados de dimensiones regulares y morfologías homogéneas similares a las reportadas para los cristales de oxalato de calcio monohidratado (COM), los cuales se formaron en toda la superficie; debido a la cantidad de cristales precipitados y a la superposición de los mismos, se dificultó su cuantificación. Sin embargo, al analizar las muestras en presencia de $0.5 \mu\text{g/mL}$ del péptido fosforilado, se observan estructuras cristalinas de mayor tamaño, con morfologías irregulares siendo visibles formaciones, de mayor anchura y menor longitud, en forma de hojuela. Al aumentar la concentración del péptido fosforilado a $1.0 \mu\text{g/mL}$ y $5.0 \mu\text{g/mL}$ se observan “fusiones” cristalinas de gran tamaño, e incluso a $5.0 \mu\text{g/mL}$ se distinguen formaciones piramidales, características del oxalato de calcio dihidratado (COD), ver Figura 2.

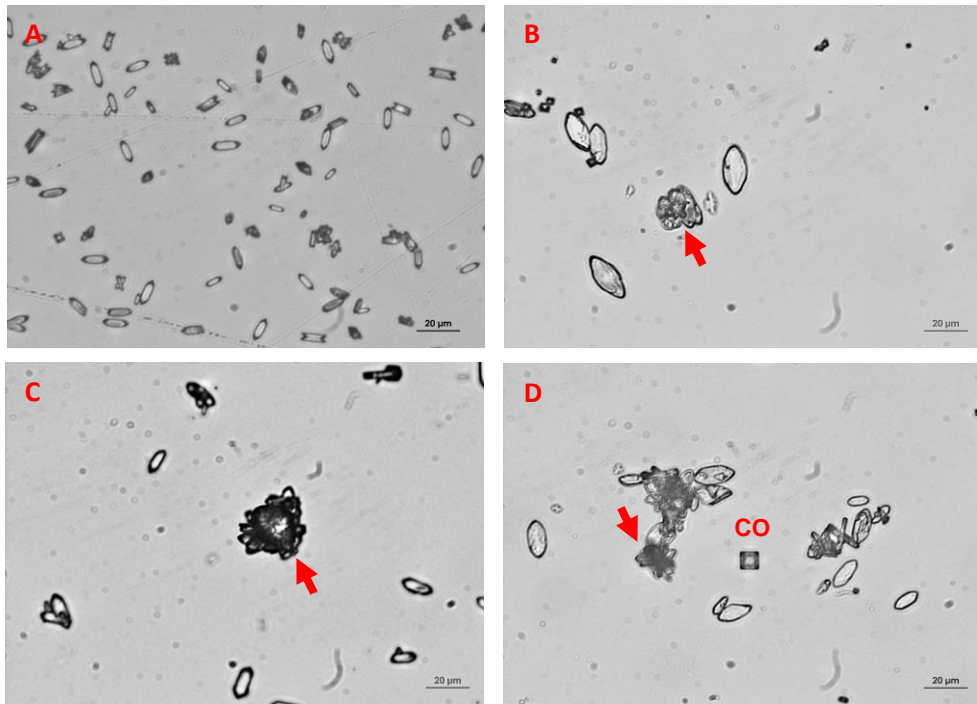


Figura 2. Fotografías tomadas con microscopio de luz: A) se observa la formación y crecimiento característico de cristales de oxalato de calcio monohidratado (COM); B, C y D) muestran el crecimiento de cristales de oxalato de calcio en presencia de 0.5, 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$ del péptido fosforilado, respectivamente. Las flechas muestran las fusiones cristalinas formadas en la presencia del péptido fosforilado, y en D) se observa la formación de oxalato de calcio dihidratado (COD). Todas las fotografías fueron tomadas a un aumento de 40x.

Las microfotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido, muestran que los cristales de oxalato de calcio formados en ausencia del péptido fosforilado crecen de manera típica al cristal COM. Los cristales crecen bien facetados, de manera aislada y con las superficies homogéneas. Mientras que los cristales formados en presencia del péptido fosforilado muestran crecimientos con escalones, se observan fusiones cristalinas de diversas dimensiones (Figura 3). Cuando se empleó la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del péptido fosforilado, los cristales muestran mayores irregularidades, siendo visibles escalones en los ángulos formados en la cara cristalina $\{121\}$ y sobre la cara $\{100\}$ y además muestran ángulos más romos.

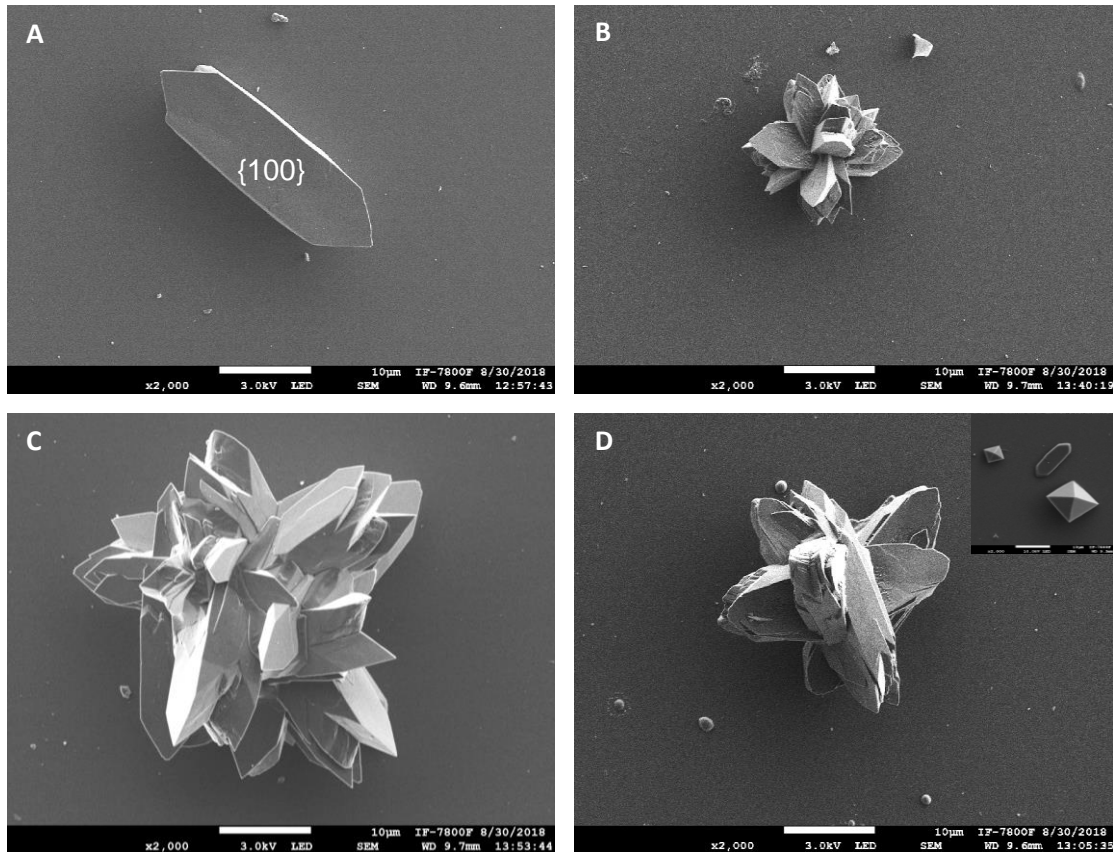
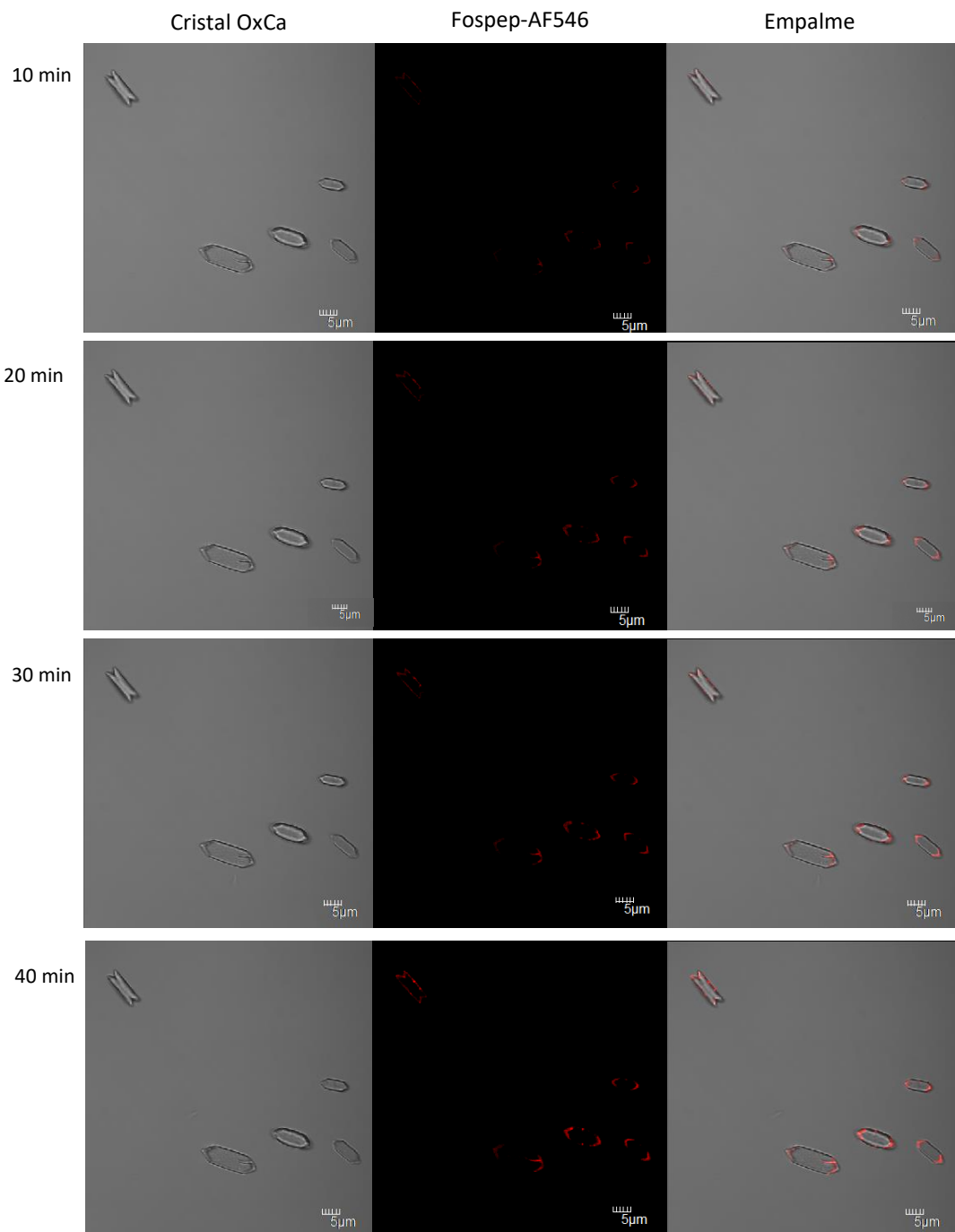


Figura 3. Microfotografías de microscopía electrónica de barrido: A morfología característica de los cristales de COM; B cristales formados en presencia de 0.5, $\mu\text{g}/\text{mL}$ del péptido fosforilado; C y D muestran la formación de cristales formados con 1 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del péptido fosforilado, respectivamente; en D también se muestra la formación de cristales piramidales que corresponden a COD.

Adsorción del péptido fosforilado en cristales de oxalato de calcio

Empleando el microscopio confocal, se evaluó la capacidad de adsorción del fospéptido marcado con AlexaFlúor-546, sobre cristales de oxalato de calcio monohidratado. Las imágenes muestran que la interacción del péptido con los cristales comienza desde los primeros 10 minutos evidenciando adsorción en los vértices de las caras $\{121\}$ y $\{100\}$. Dicha adsorción incrementa conforme avanzan los minutos, observando mayor adsorción a los 60 minutos donde la tinción se observa en todo el perímetro del cristal visto desde el plano $\langle 100 \rangle$ e incluso se observa marcaje en las caras $\{100\}$ de algunos cristales. La adsorción específica del péptido fosforilado, de los primeros 30 minutos, en los vértices de las caras $\{121\}$ y $\{100\}$ podría explicar el efecto de la molécula sobre el cambio de la morfología y crecimiento de los cristales observados en microscopía de luz y electrónica de barrido (figura 4) . Esto es, que debido a la atracción de la carga del fospéptido a los iones Calcio presentes en la cara $\{121\}$, evita la aposición de más iones modificando su hábito de crecimiento que da origen a cambios morfológicos que se han observado como parte de la formación de oxalato de calcio dihidratado, el cuál es más soluble en un ambiente acuoso.

La intensidad relativa de la fluorescencia con relación al tiempo de interacción del péptido fosforilado con los cristales, muestra una tendencia positiva en su capacidad de adsorción; demostrando que el péptido forma interacciones con caras cristalinas específicas, determinadas posiblemente por la diferencia de carga que proporciona una cara cristalina rica en calcio y la presencia de cargas negativas otorgadas por la presencia de grupos fosfato en la secuencia aminoacídica del péptido. Al realizar los análisis estadísticos, podemos observar que hubo diferencia estadísticamente significativa entre el minuto 10 y a los 60 minutos de interacción (Gráfica 1).



Continuación de figura siguiente página

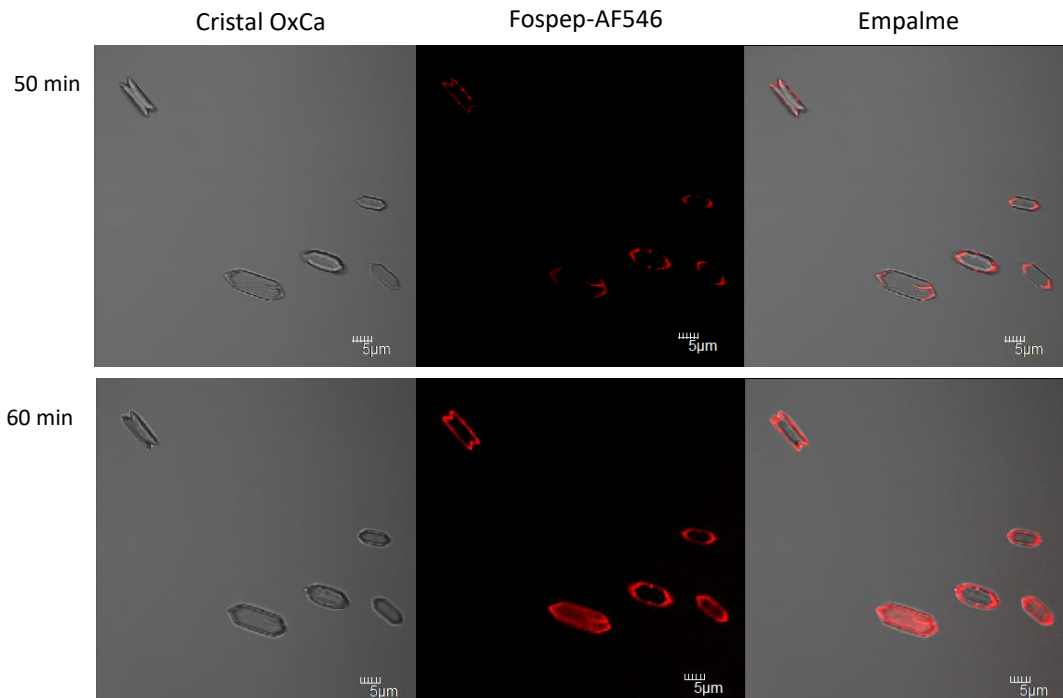
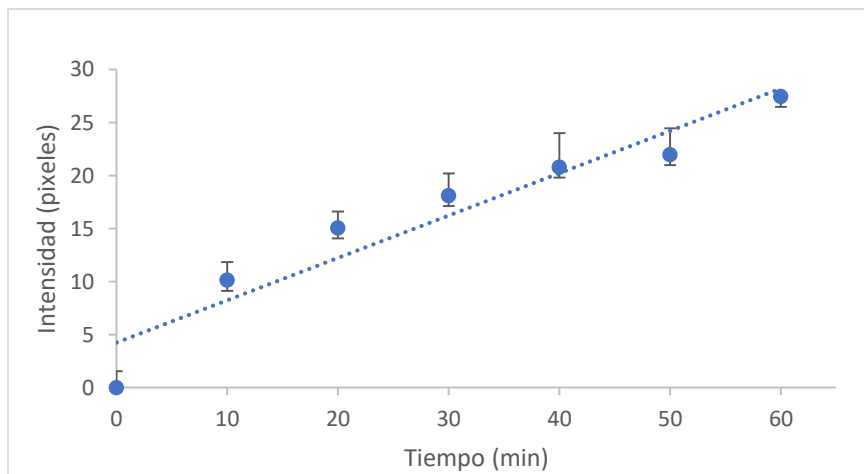


Figura 4. Microfotografías tomadas con microscopio confocal donde podemos observar la fluorescencia emitida por la adsorción del péptido fosforilado-AF546 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a caras cristalinas específicas de oxalato de calcio desde 10-60 minutos.



Gráfica 1. Cuantificación de la adsorción del péptido fosforilado marcado con AlexaFluor-546 a cristales de oxalato de calcio, desde los 10 a 60 min de incubación. Se observa la tendencia positiva de la capacidad de adsorción del péptido a caras cristalinas. Se reporta el valor promedio \pm desviación estándar ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Los cálculos renales son agregados formados principalmente por un componente mineral y en menor cantidad por compuestos orgánicos. El Oxalato de calcio, en su forma monohidratada (COM), es el mineral más comúnmente encontrado en las piedras de riñón, aunque también se ha descrito la presencia de oxalato de calcio dihidratado (COD) y otras fases minerales con mayor solubilidad. Aunque los cristales de oxalato de calcio son solo un componente secundario en el medio oral, pueden estar presentes y provocar depósitos cristalinos (cálculo dental) después de la ingesta de alimentos ricos en ácido oxálico o en enfermedades como la hiperoxaluria (desorden metabólico hereditario autosómico recesivo, que causa una producción excesiva de oxalato debido a una falla enzimática de los hepatocitos). En este trabajo hemos elegido a los cristales de oxalato de calcio como sistema de cristalización en lugar de hidroxiapatita, debido a que por su tamaño y morfología son un buen medio para el estudio de la nucleación y crecimiento de minerales de importancia biológica. Además, al usar estos cristales, permiten evaluar los procesos de nucleación, ya que el número de cristales indica la velocidad de nucleación, y además proporciona una idea de algunas condiciones fisicoquímicas básicas que prevalecen durante el crecimiento cristalino. En la literatura se ha reportado que péptidos derivados de la osteopontina (OPN), la proteína de la matriz Gla (MGP) y de proteínas salivales como la Histatina y Estaterina, son moléculas que inhiben la mineralización de dichos depósitos. El mecanismo propuesto en la inhibición del crecimiento de oxalato por parte de estas moléculas, es debido a la presencia de cargas negativas que establecen interacciones electrostáticas con cargas opuestas localizadas en ciertas caras cristalinas. Por tanto, el papel inhibitorio está íntimamente relacionado con la capacidad de adsorción de los péptidos, los cuales, se ven favorecidos por la presencia de aminoácidos negativos (ácido aspártico y glutámico), y por la cantidad de fosforilaciones

presentes en ciertos residuos aminoacídicos (tirosina y serina). En estudios recientes, se ha demostrado que el número de fosforilaciones es proporcional a la fuerza de adsorción, ya que los fosfatos favorecen las interacciones electrostáticas; sin embargo, la quimiosorción del péptido a la cara de un cristal se produce a través de los residuos de D y E (ácido aspártico y glutámico, respectivamente). En este trabajo, se empleó un péptido derivado de la proteína HACD1/CAP, cuya secuencia se encuentra formada por 14 aminoácidos, de los cuáles 3 aminoácidos poseen residuos hidrofóbicos (metionina, alanina) distribuidos a lo largo de la cadena peptídica, por lo cual se puede considerar que posee baja hidrofobicidad. Además, el péptido cuenta con tres residuos de glicinas, que debido a su tamaño otorga flexibilidad a las estructuras proteicas y peptídicas y que es característica de las secuencias intrínsecamente desordenadas. El péptido también posee 5 residuos de aminoácidos polares sin carga (3 serinas, 1 treonina, 1 asparagina), los cuales pueden establecer puentes de hidrogeno. El péptido cuenta con 3 aminoácidos de carga negativa en pH fisiológico (2 ácido aspártico y 1 glutámico); además, las tres serinas tienen incorporado un grupo fosfato en su radical, de tal manera que disminuye su punto isoeléctrico, incrementando su carga negativa. La región compuesta por aspartato-glutamato-aspartato (D-E-D) junto con el contenido de serinas fosforiladas, contribuyen en la capacidad de unión a cargas positivas, con lo que favorece al efecto inhibidor en la formación de cristales de oxalato de calcio. La formación y crecimiento de los cristales de oxalato de calcio se dan a temperatura y pH fisiológico (37°C y pH 7.2, respectivamente), por lo que el péptido fosforilado al encontrarse en esas condiciones ambientales facilita las interacciones electrostáticas que le permiten adsorberse en caras de crecimiento del oxalato de calcio, lo cual inhibe su crecimiento induciendo cambios morfológicos, tales como fusiones cristalinas o la presencia de morfologías piramidales que son características de los cristales de oxalato de calcio dihidratado (COD). El péptido fosforilado empleado mostro capacidad de adsorción en el vértice de las caras de

crecimiento cristalinas {121} y {100} en los primeros 40 minutos, esto debido a la presencia de los grupos fosfato; ya que en estudios previos se demostró que el péptido sin la presencia de fosforilaciones se adsorbe sobre la superficie de la cara {100}. Después de los 40 minutos se observa que el péptido tiene mayor adsorción en la cara {100}; esto es debido, posiblemente, a que el péptido se acumuló formando agregados en capas determinado por la interacción de los aminoácidos negativos D y E. Por otro lado, la morfología de los cristales de oxalato de calcio juega un papel muy importante en la respuesta celular, pues estudios realizados con células epiteliales renales demostraron que las morfologías del oxalato de calcio monohidratado inducen la muerte celular mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno, además de inducir lesiones en las membranas celulares; mientras que cristales con ángulos romos y la presencia de cristales piramidales son menos citotóxicos para las células renales.

CONCLUSIÓN

En estudios previos, se demostró que el péptido CAPI, tiene la capacidad de inhibir la formación y crecimiento de cristales de oxalato de calcio; mediado por las interacciones electrostáticas establecidas por la presencia de aminoácidos de carácter negativo, esto mediante la adsorción del péptido sobre caras cristalinas específicas que limitan la deposición de iones y el eventual crecimiento del mineral. En este trabajo, se evaluó la capacidad de inhibición de un péptido fosforilado, en tres posiciones específicas (en 3 serinas de la secuencia aminoacídica), en la formación y crecimiento de cristales de oxalato de calcio. Los resultados obtenidos demuestran que las fosforilaciones presentes, sumadas a los aminoácidos negativos favorecen la interacción electrostática con cargas positivas, presentes en caras de crecimiento que conforman el cristal de oxalato de calcio, promoviendo la formación de oxalato de calcio dihidratado y cambios en la morfología de los cristales monohidratados. De esta manera, se demuestra el papel de los grupos fosfato en el proceso de mineralización; además de presentar evidencia de un péptido natural que se encuentra presente en una proteína con la capacidad de promover la formación de cristales de hidroxiapatita; con lo cual se abren nuevas alternativas en el estudio de péptidos biofuncionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Azzopardi PV, O'Young J, Lajoie G, Karttunen M, Goldberg HA, Hunter GK. (2010) Roles of electrostatics and conformation in protein-crystal interactions. *PLoS One* 19;5(2)
2. Weiner, S. And Dove, PM (2003) An overview of biomineralization process and the problem of the vital effect. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry* 54, 1-29
3. Mann, S (1983) Mineralization in biological systems, *Struct. Bonding* 54, 125-174
4. Wetherbee R (2002) Biomineralization. The diatom glasshouse. *Science* 298, 547
5. Addadi L, Joester D, Nudelman F and Weiner S (2006) Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization process. *Chemistry* 12, 980-987
6. Hunter GK and Goldberg HA (1993) Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8562-8565
7. Addadi L and Weiner S (1985) Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4110-4114
8. Gerbaud V, Pignol D, Loret E, Bertrand JA, Berland Y, Fontecilla-Camps JC Canselier JP, Gabas N and Verdier JM (2000) Mechanism of calcite crystal growth inhibition by the N-terminal undecapeptide of lithostathine. *J Biol Chem* 275, 1057-1064
9. 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
10. Gorski JP (1992) Acidic phosphoproteins from bone matrix: a structural rationalization of their role in biomineralization. *Calcif Tissue Int* 50, 391-396
11. Hunter GK, Kyle CL and Goldberg HA (1994) Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the

Osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* 300(Pt3), 723-728

12. He G, Dahl T, Veis A, George A. Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat Mater* 2003;2:552–8.
13. Weiner S, Addadi L. Acidic macromolecules of mineralized tissues: the controllers of crystal formation. *Trends Biochem Sci* 1991;16:252–6.
14. López, K., 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 hidroxiapatita. 2018.
15. Sear, R. P., Quantitative studies of crystal nucleation at constant supersaturation: experimental data and models. *CrystEngComm*, 2014. 16(29): p.6506-6522.
16. Toth, G.I., et al., Heterogeneous crystal nucleation: the effect of lattice mismatch. *Phys Rev Lett*, 2012. 108(2): p.025502.
17. Lin, C., C. Rüssel, and S. Dai, Chalcogenide glass-ceramics: Functional design and crystallization mechanism. *Progress in materials Science*, 2018. 93: p. 1-43.
18. Wang, T., et al., Recent progress of continuous crystallization. *Journal of industrial and Engineering Chemistry*, 2017. 54: p. 15-29.
19. Jia, F., D. Zhao, and M. Wang, Selective nucleation and self-organized crystallization. *Progress in crystal Growth and characterization of Materials*, 2016. 62(2): p. 252-272.
20. Garcia-garduño, m.v. and J. Reyes-Gasga, La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 2006. 9(2): p. 90
21. Anderson, H.C., R. Grimella, and S.E. Tague, The Role of Matrix Vesicles in Growth Plate Development and Biomineralization. *Frontiers in Bioscience* 2005. 10: p.822-837.
22. Kawasaki, K., A.V. Buchanan, and K.M. Weiss, Biomineralization in humans: making the hard choices in life. *Annu Rev Genet*, 2009. 43: p.119.
23. Gerke, V. and S. E. Moss, Annexin membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta*, 1997. 1357(2): p.129.
24. Anderson, H.C., Molecular Biology of Matrix Vesicles. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1995 (314): p.265-280.
25. Delak K, Harcup C, Lakshminarayanan R, Sun Z, Fan Y, Moradian-Oldak J, et al. The tooth enamel protein, porcine amelogenin, is an intrinsically disordered protein with an extended molecular configuration in the monomeric form. *Biochemistry* 2009;48:2272–81.

26. Ortégón, R., J, Aguilar., A, Álvarez., N, Méndez, Perfil epidemiológico de las hospitalizaciones por urolitiasis en el Estado de Yucatán, México. *Rev Mex Urol.* 2019;79(5):pp. 1-11.
27. Martínez, M., Hernández MA., Jaspersen,J., Virgen, F., Rosas, A., Carillo,LD. Síndrome metabólico en pacientes con urolitiasis: una serie actual. *Rev Mex Urol.* 2018 nov-dic;78(6):414-18.
28. Wesson, J.A., et al., control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules. *Kitney Int,* 1998. 53(4): p. 952.
29. Chen, D.,Zhao, and G.R Mndy,Bonemorphogenetic proteins. *Growth Factors,*2004.22 (4):p.233-41
30. Delak K, Harcup C, Lakshminarayanan R, Sun Z, Fan Y, Moradian-Oldak J, et al. The tooth enamel protein, porcine amelogenin, is an intrinsically disordered protein with an extended molecular configuration in the monomeric form. *Biochemistry* 2009;48:2272–81.
31. Currey JD (1999) The design of mineralized hard tissues for their mechanical functions. *J Exp Biol* 202, 3285-3294
32. Lowenstam HA and Weiner S (1989) *On biomineralization.* Oxford University Press, USA
33. Ishisaka,M.,Y. Oshima, and H. Yanagawa, Protein anatomy: structure and function of peptidefragments corresponding to the secondary structure units of barnase.*J Biochem,* 2001. 129 (6: p971
34. Janairo,J.I.B., Peptide-Mediated Biomineralization, in *Peptide-Mediated Biomineralization.* 2016, Springer Briefs in Materials: Singapore. P72
35. Addison, W.N., et al Phosporylation-dependent mineral-type specificity for apatite-binding peptide sequences. *Biomateials,*2010. P-9422
36. Vázquez G, *Introducción a la Microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas.* 1º Edición. Fondo de cultura económica. México 2000
37. Negroni M, *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica.* 3ºEdición. Editorial Médica panamericana. Argentina 2018
38. Brok, *Biología de los microorganismos.* 14º Edición. Editorial Pearson Educación. Madrid 2015
39. Geneser, *Histología.* 4º Edición. Editorial Médica panamericana. España 2014

40. Lindhe J, Periodontología Clínica e implantología odontológica: conceptos básicos. 6° Edición. Tomo 1. En: Lang P. Editorial Médica panamericana. España 2017
41. Carranza FA, Neuman MG. Clinical periodontology. 11th Edition. Saunders Company 2012 USA.
42. GrzesikWJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. Crit Rev Oral Biol Med 2002;13:474–84.
43. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. J Cell Physiol 2012;227:649–57.
44. Serrano J, Romo E, Bermúdez M, Narayanan AS, Zeichner-David M, Santos L, et al. Bone regeneration in rat cranium critical-size defects induced by cementumprotein 1 (CEMP1). PLoS One 2013;8:e78807
45. Alvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodríguez Carmona B, Arzate H (2006). Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). Bone 38: 409-419.
46. 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.
47. Valdés De Hoyos A, Hoz-Rodríguez L, Arzate H, Narayanan AS. Isolation of protein-tyrosine phosphatase-like member-a variant from cementum. J Dent Res. 2012;91:203-209.
48. 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.
49. Treves-Manusevitz S, Hoz L, Rachima H, Montoya G, Tzur E, Vardimon A, Narayanan AS, Amar S, Arzate H, Pitaru S. Stem cells of the lamina propia

of human oral mucosa and gingiva develop into mineralized tissues in vivo. *J Clin Periodontol* 2013;40: 73–81.

50. Pitaru S, Narayanan SA, Olson S, Savion N, Hekmati H, Alt I, et al. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodontol Res* 1995;30:360–8.
51. Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res* 1996;11:686–92.
52. Yoshii T, Harada F, Saito I, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Maeda T. Immunoexpression of aquaporin-1 in the rat periodontal ligament during experimental tooth movement. *Biomed Res* 2012;33:225–33.
53. Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, et al. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 2001;29:242–8.
54. Montoya G, Arenas J, Romo E, Zeichner-David M, Alvarez M, Narayanan A, Velázquez U, Mercado G, Arzate H. Human recombinant cementum attachment protein (hrHACD1/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. *Bone*. 69 (2014), 154 – 164.