



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
CIENCIAS ODONTOLÓGICAS BÁSICAS: BIOLOGÍA BUCAL

REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LITERATURA DE PÉPTIDOS PROMOTORES DE LA  
REMINERALIZACIÓN DEL ESMALTE DENTAL.

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

PRESENTA:  
**LUIS FERNANDO RAMÍREZ GONZÁLEZ**

TUTOR: DR. GONZÁLO MONTOYA AYALA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2022



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.

## Agradecimientos

Al Dr. Gonzalo Montoya, por su paciencia y sus palabras de aliento cuando parecía que el camino se terminaba, por recibirme como su alumno y orientarme siempre que lo necesité, por cada consejo y conocimiento compartido.

Al Dr. Higinio Arzate, por abrirme las puertas del laboratorio y brindarme la confianza para ser parte de su equipo, también agradezco que fuera parte de mi comité tutor y mi maestro en las asignaturas del programa, los conocimientos que nos otorga son invaluableles.

Al Dr. Jesús Arenas, por ser parte de mi comité tutor y mi profesor, gracias por la confianza, el tiempo, la paciencia, las ideas y los consejos.

*“Si he llegado a ver más lejos que otros es porque me subí a hombros de gigantes”*

-Isaac Newton

A mis profesores durante la maestría, su tiempo y dedicación me hicieron crecer, conocer y comprender conceptos que me ayudan a crecer más de lo que imaginé

*“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”*

-Albert Einstein

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser siempre mi hogar, y darme todas las herramientas para mi desarrollo personal y profesional.

Al programa de Maestría y Doctorado en ciencias médicas, odontológicas y de la salud por darme la oportunidad de llegar cada vez más lejos

*“La educación ayuda a la persona a aprender a ser lo que es capaz de ser”*

-Hesiodo

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-IN203920) por el apoyo otorgado para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo en la beca otorgada para mis estudios de maestría, con el número de CVU 1084781.

*“Invertir en conocimientos produce siempre los mejores beneficios”*

-Benjamin Franklin

A la Mtra. Guadalupe Ureiro porque siempre me orientó y me regaló parte de su tiempo cuando lo necesité.

A mis compañeros y amigos Isa, Pavel, Julio, y Lis, no pude pedir mejores compañeros para alcanzar este logro.

A Alberto, por ser mi compañero de laboratorio y de clases, por ser un excelente colega y un gran amigo, agradezco poder crecer con alguien como tú, te admiro mucho.

A mis amigos Fidel, Rigel, Itzi, Gaby, Vlady, Fer, Karla y Mau, después de tantos años siguen aquí, siendo el cimiento moral para seguir adelante y estar siempre ahí, en los momentos agradables y en los que no lo son tanto.

***“Deben buscarse los amigos como los buenos libros. No está la felicidad en que sean muchos ni muy curiosos; sino pocos, buenos y bien conocidos”***

-Mateo Alemán

A Oscar, a Rodolfo, a Juan y a todo el equipo de E&B que creyeron en mi y que me permitieron seguir siendo parte de este gran equipo.

***“El trabajo en equipo es el secreto que hace que gente común consiga resultados poco comunes”***

- Ifeanyi Onuoha

A mis padres, no hay palabras que alcancen para describir todo el apoyo que me brindan, sin ustedes no estaría aquí.

***“El amor de unos padres por sus hijos no se parece a nada en este mundo. Se atreve a todo y todo lo aplasta si se interpone en su camino”***

-Agatha Christie

A los que siempre estuvieron ahí, pero ya no están, los extraño mucho.

Eva, Adolfo... les dedico este logro y todos los que vengan.

***“Nada hay más grande para las almas humanas que sentir que están unidas de por vida, juntas en recuerdos silenciosos e indecibles”***

-George Eliot

El camino apenas empieza

*“Me parece haber sido sólo un niño jugando en la orilla del mar, divirtiéndose y buscando una piedra más lisa o una concha más bonita de lo normal, mientras el gran océano de la verdad yacía ante mis ojos con todo por descubrir”.*

- Isaac Newton

## Resumen

**Antecedentes.** El esmalte dental es el tejido más duro sintetizado por cualquier organismo vivo, esta característica física no lo exime de ser altamente susceptible a la disolución química de sus componentes en medios con pH menor a 6, esto es debido a que es el único tejido del diente expuesto al medio bucal. La disolución progresiva de dichos cristales (por caries y/o erosión) favorece un desequilibrio en el proceso de desmineralización-rem mineralización y tiene como consecuencia la generación de una lesión de tipo mancha blanca que puede dar lugar a una lesión cavitada. Se han buscado alternativas terapéuticas para detener, e incluso revertir la pérdida de los cristales de hidroxiapatita que constituyen el esmalte dental, siendo el más utilizado el tratamiento con fluoruro en distintas presentaciones. Aun cuando se trata del “estándar de oro” para el tratamiento de las lesiones cariosas iniciales o “mancha blanca”, se ha demostrado que los cristales regenerados no tienen las características físicas que aseguren su permanencia en la superficie del esmalte o que imiten la compleja arquitectura de este tejido; por lo cual, se han buscado alternativas basadas en el crecimiento dirigido de cristales facilitado por moléculas polipeptídicas que imiten a las proteínas encontradas en la matriz orgánica que dan origen al esmalte. En la literatura hay múltiples estudios que emplean secuencias peptídicas naturales o diseñadas *in silico* que, a partir de estrategias técnicas y metodológicas específicas han demostrado poseer la capacidad de nuclear y dirigir el crecimiento de cristales minerales. Tomando esto en cuenta se diseñó un protocolo de revisión sistemática con el objeto de identificar las secuencias de aminoácidos con la capacidad, no solo de promover la nucleación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita, sino también de hacerlo de una manera ordenada para imitar la morfología del esmalte dental, sus características químicas, físicas y mecánicas y con ello, detener la progresión de las lesiones de tipo mancha blanca a lesiones cavitadas, e incluso regenerar los cristales perdidos.

**Objetivos.** Analizar y describir el uso de péptidos como agentes remineralizantes sobre lesiones de tipo mancha blanca en el esmalte dental. **Metodología.** Los estudios se identificaron y seleccionaron a partir de los principales buscadores de literatura médica incluyendo MEDLINE (a través de Pubmed), LILACS, SciELO, Ovid, Web of Science, Google académico, Academic Search Ultimate, Applied Science And Thecnology Source Ultimate, CINAHL with full text, Dentistry & Oral Sciences Source, E-Journals, MedicLatina (a través de EBSCO) y TESIUNAM. Se incluyeron todos los ensayos experimentales *in vitro* que analizaran el empleo de péptidos para remineralización de lesiones tipo mancha blanca sobre esmalte dental humano. **Resultados.** La búsqueda de artículos se realizó de manera continua desde el día 26 de abril del 2021. Una vez realizada la revisión de títulos y resúmenes, se obtuvieron 55 estudios para la extracción de información. Los estudios incluidos se publicaron entre 1997 y 2021. A partir del análisis de los artículos seleccionados se mostró que el péptido más estudiado es el Fosfopéptido de caseína (CPP) reportado en 22 estudios, seguido por el péptido de autoensamblaje P<sub>11</sub>-4 reportado en 14 estudios. Los autores recurrieron a distintas técnicas para la caracterización física, química y de las propiedades mecánicas de los depósitos formados. La técnica más recurrida para el análisis de la morfología de los depósitos es la microscopía electrónica de barrido (28 estudios), seguida de microscopía de fuerza atómica (11 estudios), microscopía electrónica de transmisión (5 estudios) e imagen

radiológica (en 5 estudios). Además, diversos estudios emplearon técnicas como EDS/EDX, de fluorescencia, detección de iones captados/liberados desde la muestra y espectroscopías vibracionales para el análisis químico de los depósitos formados. Las fases minerales de los depósitos se identificaron principalmente por difracción de rayos X y difracción electrónica. Por último, las pruebas mecánicas más reportadas se enfocaron en la determinación de la dureza (mediante ensayo de dureza de Vickers, ensayo de dureza de Knoop y nanoindentación), módulo elástico (nanoindentación) y fuerza de adhesión (ensayo de última emisión acústica al rasgado) de los depósitos formados. **Conclusiones.** En esta revisión se encontró una gran variedad de estudios donde emplean secuencias peptídicas con potencial para la remineralización de lesiones de tipo mancha blanca en esmalte dental humano. Se han desarrollado estrategias que emplean secuencias aminoacídicas naturales, péptidos sintéticos e incluso quiméricos que aprovechan las cualidades de regiones funcionales en una o varias proteínas para promover la remineralización; ya sea interactuando con caras cristalinas, o que tiene la capacidad de autoensamblarse para formar un andamio que dirija el crecimiento de cristales que cumplan con las características físicas, químicas y mecánicas del esmalte. Además, se observó una gran heterogeneidad de técnicas para la caracterización de los depósitos formados. Solo algunos de estos péptidos ya se utilizan en el ambiente clínico (CPP y P<sub>11-4</sub>); sin embargo, los resultados de las pruebas mecánicas aún no son del todo satisfactorias, por lo que aún debemos ser cautelosos con su aplicación clínica.

# Contenido

Introducción.....	7
Marco Teórico.....	8
Planteamiento del problema y Justificación .....	19
Objetivos.....	20
Metodología.....	20
Resultados.....	22
<b>Resultados de la búsqueda.</b> .....	22
Evaluación del riesgo de sesgo.....	23
<b>Péptidos incluidos en esta revisión</b> .....	25
Fosfopéptido de Caseína.....	28
P <sub>11-4</sub> .....	29
Ácido poli-γ-glutámico .....	30
Histatina 5 (H5-sPH5).....	31
Péptidos derivados de la estaterina (DpSpSEEKC / DDDEKC o Péptido 7) .....	31
Péptidos derivados de la fosfoproteína dentinaria (3DSS/8DSS).....	32
Modificación de péptidos derivados de la fosfoproteína dentinaria (NSS/5NSS/3NSS) .....	33
Péptido derivado de Tuftelina (TDP) .....	34
Péptido sintético análogo de proteínas no amelogeninas (NAA).....	34
Péptidos derivados de amelogenina .....	35
C-AMG/Péptido “B” .....	35
Péptidos derivados de amelogenina (shADP5 y MPP3).....	35
Péptido de amelogenina rico en leucina (LRAP-mLRAP).....	36
QPA4+TKREEVD .....	37
QP5 .....	37
Péptido “A” .....	37
P26-P32.....	38
<b>Caracterización de los depósitos neoformados por efecto de los péptidos</b> .....	39
Conclusiones.....	46
Referencias .....	47



## Introducción

El esmalte dental es el tejido más duro sintetizado por cualquier organismo vivo, está constituido principalmente por cristales de hidroxiapatita (HAP); la dureza de este material está determinada no solo por el alto contenido mineral si no por la organización en prismas ultra compactados que lo constituyen; esta característica física no lo exime de ser altamente susceptible a la disolución química de sus componentes en medios con pH menor a 6; esto se debe a que es el único tejido dental expuesto al medio bucal, por lo que puede estar en contacto directo con los ácidos producidos por las bacterias en la biopelícula dental y moléculas ácidas de los alimentos incluidos en la dieta. La disolución progresiva de los cristales del esmalte dental favorece un desequilibrio en el proceso fisiológico de desmineralización-remineralización y tiene como consecuencia la generación de lesiones de tipo mancha blanca que, con el tiempo, pueden progresar en lesiones cavitadas irreversibles conocidas como caries dental. Como se mencionó, los cristales tienen un ciclo natural de desmineralización y remineralización que depende del pH y de la concentración de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  disueltos en la saliva. Aprovechando este proceso natural se han buscado alternativas terapéuticas para detener e incluso revertir la pérdida estas lesiones. El tratamiento más utilizado es el empleo de fluoruro en distintas presentaciones, desde dentífricos de uso diario, hasta barnices utilizados en la práctica dental profesional; sin embargo, aun cuando se considera como el “estándar de oro” para el tratamiento de las lesiones de tipo mancha blanca, se ha demostrado que los cristales regenerados no tienen las características físicas que aseguren su permanencia en la superficie del esmalte o que imiten la compleja arquitectura de este tejido. Debido a esto, se ha recurrido a diversas estrategias basadas en el uso de moléculas polipeptídicas que controlan la formación y crecimiento cristalino, que con ayuda del desarrollo tecnológico ha permitido emplear una miríada de herramientas que hacen posible una caracterización más especializada de los depósitos formados.

# Marco Teórico

## Esmalte dental.

El esmalte dental es un tejido ultra-conservado entre los mamíferos que recubre la corona del diente<sup>1</sup>; se origina durante un proceso llamado amelogénesis el cual, es llevado a cabo por células de origen ectodérmico llamadas ameloblastos. Estas células secretan una matriz no mineralizada compuesta por proteínas (principalmente amelogenina) que dirigen la mineralización del tejido y que al propio tiempo se degradan gracias a la acción de enzimas como la metaloproteínasa de matriz 20 MMP20<sup>2-4</sup>. De acuerdo con estudios recientes, los productos de la degradación proteica (péptidos) son los responsables de dirigir la organización de los cristales minerales a manera de prismas, estos se encuentran rodeados por una capa llamada vaina del esmalte, que contiene proteínas y agua y que representa apenas el 5% del peso total del esmalte<sup>4-6</sup>. Una vez que ha terminado la síntesis del esmalte las células que le dan origen mueren y con ellas cualquier posibilidad de regeneración.

El esmalte dental está compuesto por una biocerámica nanocompuesta mineralizada<sup>5,7,8</sup> específica del esmalte dental<sup>9</sup> constituida principalmente —entre un 94 y 96% del total de peso<sup>1,2,10-14</sup>— por cristales de hidroxiapatita (cuya fórmula estequiométrica es  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ <sup>14,15</sup>); pero que, por su origen biológico contiene elementos traza que incluyen iones  $CO_3^{2-}$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $F^-$ ,  $Zn^{2+}$ <sup>2,10,16</sup>. Debido a su alto contenido mineral, representa al biomaterial más duro encontrado en los seres vivos<sup>17</sup>.

Los cristales de HAP del esmalte tienen un patrón de crecimiento paralelo organizado en “prismas”<sup>5,8,10,12,18,19</sup> o “varillas”<sup>1,3,5,9,13</sup> que recorren todo su espesor, desde la unión amelodentinaria hasta la superficie<sup>1,3,5</sup> (Figura 1) La dirección de los prismas es generalmente perpendicular a la superficie de la dentina, excepto en la región cervical donde son más bien oblicuos<sup>3</sup>.

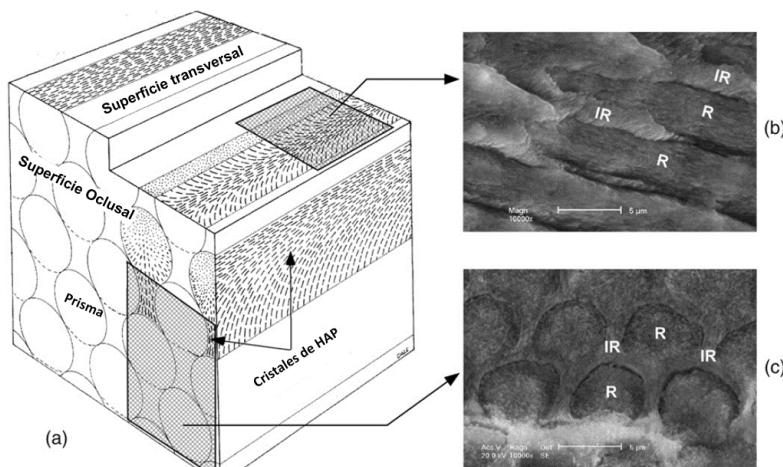


Figura 1 . a) Ilustración esquemática de la estructura jerárquica del esmalte dental propuesta por Eisenmann (1998). b) y c) imágenes obtenidas mediante SEM de distintas perspectivas de los prismas. He LH, Swain M V. Understanding the mechanical behavior of human enamel from its structural and compositional characteristics. J Mech Behav Biomed Mater. 2008;1(1):18–29.

Sorprendentemente, a pesar de su alta dureza se trata de un tejido sumamente resiliente, lo que puede deberse a: 1.- Su asociación con otro tejido mineralizado subyacente (dentina) con mayor contenido de agua y proteínas. 2.-La compleja organización jerárquica en forma de prismas que le brindan mayor resistencia a fuerzas <sup>1,5,9,19</sup> y 3.- El recubrimiento interprismático que brinda la vaina del esmalte. Todos estos factores lo definen como un composite ortotrópico; es decir, presenta un comportamiento mecánico diferente en distintas direcciones(Figura 2)<sup>20</sup>. Esta característica permite al esmalte resistir las gigantescas fuerzas de masticación ( $\approx 770\text{N}$ ) desde distintas direcciones, sin perder su estructura<sup>1,15</sup>.

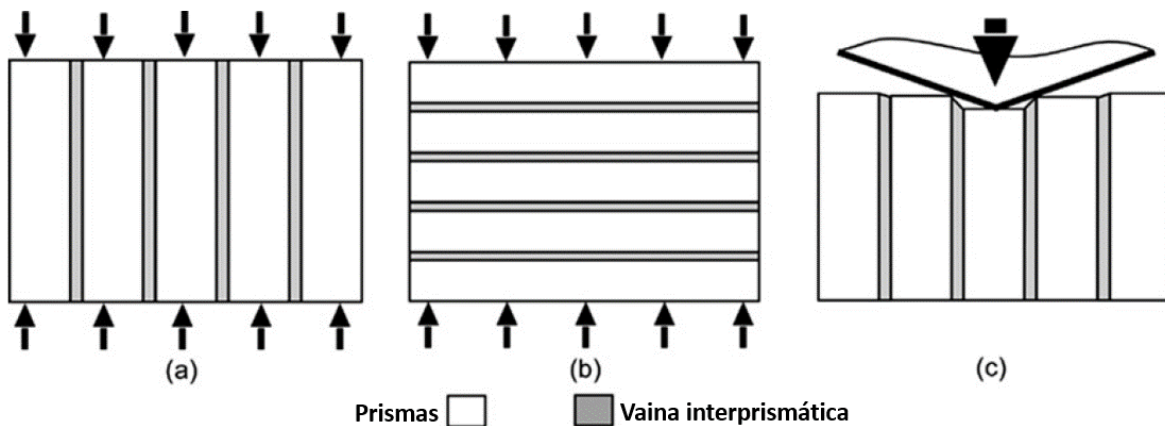


Figura 2. Ilustración esquemática del modelo de composite ortotrópico; se representa la respuesta de la estructura del esmalte en distintas condiciones, a) tensión uniforme. b) estrés uniforme. c) carga de indentación. He LH, Swain M V. Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2008;1(1):18–29

## Caries dental

El esmalte es el único tejido del diente que, en condiciones de salud, se encuentra en contacto directo con el medio bucal, donde se lleva cabo un proceso dinámico de desmineralización-remineralización dependiente de pH. El proceso de desmineralización de los prismas del esmalte está determinado por la solubilidad de la hidroxiapatita, la cual depende directamente del pH: al encontrarse en un medio ácido los iones de  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{OH}^-$  se unen a iones  $\text{H}^+$  del medio para formar  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Figura 3). Cuando los iones de  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{OH}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran en sobresaturación, la disolución de hidroxiapatita cede y se reincorporan a la estructura cristalina, repitiendo el ciclo hasta alcanzar de nuevo la saturación (fenómeno conocido como remineralización). Por tanto, la remineralización del esmalte requiere la sobresaturación de los iones perdidos y los cristales de hidroxiapatita parcialmente desmineralizados pueden crecer a su tamaño original. Sin embargo, el esmalte maduro no puede regenerarse a sí mismo después de una pérdida mineral sustancial, que a menudo ocurre como consecuencia de la erosión o debido a la caries dental <sup>21</sup>.

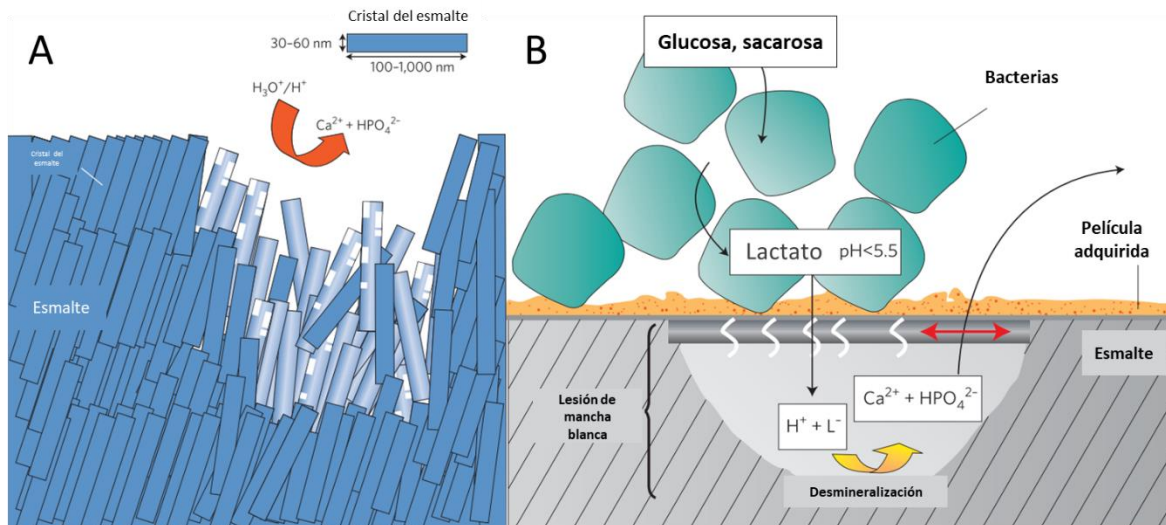


Figura 3. A. Esquema que representa la disolución de los prismas del esmalte por ataque ácido. B. Estadio temprano de la caries dental. En este modelo la caries es producto de la actividad debajo de una biopelícula; las bacterias incluidas en esta película metabolizan azúcar y otros carbohidratos y producen lactato y otros ácidos con lo que se lleva a cabo el intercambio iónico y disolución de cristales que se ilustra en A. Hannig M, Hannig C. Nanomaterials in preventive dentistry. Nat Nanotechnol. 2010;5(8):565-9.

La caries dental está definida como:

“Una enfermedad dinámica multifactorial, no transmisible, mediada por una biopelícula y modulada por la dieta que resulta en la pérdida neta de tejidos mineralizados” (Fejerskov 1997; Pitts *et al.* 2017)<sup>22</sup>. El desarrollo de lesiones cariosas es determinado por factores biológicos, psicológicos, del comportamiento y ambientales<sup>22</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud se trata de la enfermedad no transmisible más común y afecta alrededor del 50% de la población mundial<sup>23</sup>, está caracterizada por la desmineralización del esmalte, la dentina o el cemento causada por bacterias productoras de ácidos que alteran el proceso dinámico de desmineralización-rem mineralización. Durante el proceso carioso podemos identificar un estadio inicial o caries incipiente identificada clínicamente como una mancha blanca; estas lesiones son sitios de desmineralización que resultan en una superficie porosa con menor translucidez y cuya consecuencia es la de una apariencia opaca<sup>21</sup>; es importante resaltar que este término solo se refiere a la apariencia clínica y no representa o define la actividad de la lesión<sup>22</sup>(Figura 4). Dado que la lesión de mancha blanca puede ser reversible, la síntesis de esmalte es de gran interés para los odontólogos<sup>5,19,24</sup>.



Figura 4. Lesiones de mancha blanca (WSL). Heymann GC, Grauer D. A contemporary review of white spot lesions in orthodontics. *J Esthet Restor Dent.* 2013;25(2):85–95.

## Terapéutica actual y alternativas para remineralización del esmalte dental.

El enfoque tradicional para la recuperación de cristales perdidos en ambientes ácidos es la ingeniería *in situ* o remineralización de la superficie del esmalte; este, se aprovecha de la capacidad de la superficie del esmalte de alterar su estructura química o mecánica al crecer capas de apatita parecidas al esmalte utilizando sustratos de proteínas del esmalte y soluciones específicas para el crecimiento de apatitas<sup>9</sup>.

En la actualidad el estándar de oro para la recuperación de cristales sobre la superficie de esmalte desmineralizada es el uso de fluoruros en distintas presentaciones (barniz, pasta, políticas públicas de fluoración de sal y/o agua). Los beneficios relacionados al fluoruro para la salud dental y resistencia del esmalte contra la caries son reconocidos desde los estudios de Mckay y Black<sup>25</sup>. El fluoruro afecta las propiedades del esmalte a través del intercambio del grupo hidroxilo en la hidroxiapatita por iones flúor para formar fluorapatita o flúor-hidroxiapatita, esta fase mineral con iones sustituidos es más dura y menos soluble, lo que la vuelve más resistente a ambientes ácidos, sin embargo, el uso excesivo de fluoruro puede derivar en la aparición fluorosis<sup>9</sup>.

Los enfoques para la regeneración del esmalte se han visto limitados por la alta complejidad para imitar el proceso de amelogénesis y con ello el crecimiento de prismas similares a los encontrados en el esmalte dental; se han desarrollado métodos con los que se ha generado tejido parecido al esmalte, lo que nos acerca cada vez más a la regeneración de este tejido tan especializado<sup>4,9,12,13,19,24,26–31</sup>.

Las alternativas actuales incluyen enfoques físicos, ingeniería bioquímica, cultivos celulares del órgano del esmalte, ingeniería tisular y regeneración dental completa; todas estas técnicas han tenido avances importantes para la síntesis de tejido parecido al esmalte, pero tienen limitaciones importantes para su aplicación <sup>9</sup>.

## **Métodos de caracterización de depósitos minerales formados sobre esmalte dental desmineralizado**

El avance tecnológico ha permitido el desarrollo de biomateriales a escala micro y nanométrica. El uso de técnicas cualitativas y cuantitativas se han complementado para proveer información trascendental acerca de las características y propiedades fisicoquímicas de los depósitos minerales neoformados a partir de estrategias metodológicas novedosas encaminadas a la remineralización/regeneración del esmalte dental. Algunas de las técnicas de caracterización más comúnmente empleadas se describen a continuación.

- **Técnicas de caracterización morfológica:**

Como se mencionó, una característica que diferencia al esmalte de otros tejidos mineralizados es su estructura y organización, para ello se han utilizado técnicas de imagen que permitan observar forma, tamaño y topografía de los depósitos que se forman sobre la superficie gracias al uso de péptidos.

- **Microscopía electrónica de Barrido —SEM— (Scanning Electron Microscopy)**

La microscopía electrónica de barrido (SEM; siglas en inglés de Scanning Electron Microscopy) es una técnica que proporciona imágenes y datos físico-químicos de la superficie de cuerpos generalmente opacos a los electrones, como lo son los minerales, por medio de un delgadísimo haz de electrones que recorre dicha superficie y detectores que traducen las señales que de ella emanan<sup>32</sup>. Es la técnica más importante para el análisis de características morfológicas como tamaño, forma y topografía de los especímenes, ya que permite ver objetos mucho más pequeños y texturas más finas que los microscopios ópticos. Esto se debe a que tienen un mayor poder de resolución<sup>33</sup>. Los detectores más empleados en el estudio de muestras biológicas son: los electrones secundarios emitidos por la muestra, los de electrones del haz retrodispersados por la muestra, y los de rayos X emitidos por la muestra<sup>32</sup>

- **Microscopía electrónica de transmisión —TEM— (Transmission Electron Microscopy)**

La microscopía electrónica de transmisión (TEM; siglas en inglés de Transmission Microscopy) es una técnica de alta resolución que suele ser usada para el análisis de estructuras de escala nanométrica; este tipo de microscopía permite la observación de estructuras a mucho mayor aumento que la microscopía electrónica de barrido. Una desventaja de esta técnica es que se requieren muestras sumamente delgadas o en polvo para su observación.

La TEM está basada en la interacción entre un haz de electrones de alta energía y una muestra muy delgada. La amplitud y variación de fase del haz transmitido provee imágenes de las nanopartículas<sup>34</sup>. Esta técnica proporciona una resolución interatómica que permitiría identificar las celdas unitarias presentes en los minerales, por lo que permite realizar mediciones analíticas<sup>35</sup>.

#### - **Microscopía de fuerza atómica —AFM— (Atomic Force Microscopy)**

La microscopía de fuerza atómica (AFM; Atomic Force Microscopy) es una técnica comúnmente utilizada para la caracterización de nanopartículas y nanomateriales; ofrece información cualitativa y cuantitativa de una superficie incluyendo tamaño, forma, topografía y rugosidad. El uso de AFM permite caracterizar partículas desde 1nm hasta 8µm y ofrece la oportunidad de visualizar imágenes en tres dimensiones<sup>36</sup>.

El microscopio de fuerza atómica consiste en una punta afilada soportada por un brazo, la punta se mueve en respuesta a interacciones con la superficie y este movimiento es registrado por un láser con un fotodiodo<sup>37</sup>. Este microscopio puede operarse en 2 modos básicos: contacto y “tapping”. En el modo contacto la punta se encuentra en contacto continuo con la superficie a analizar, mientras que en el modo “tapping” la punta se mueve en contacto intermitente con la muestra<sup>37</sup>.

AFM es utilizada también para medir y localizar distintas fuerzas como fuerza de adhesión, fuerzas magnéticas y propiedades mecánicas para caracterizar así la superficie de las muestras.<sup>37</sup>

#### • **Técnicas de identificación química.**

Como se ha resaltado, una de las características principales del esmalte dental es su alto contenido mineral y su composición por iones inorgánicos; para caracterizar los cambios químicos en la superficie del esmalte se han utilizado técnicas que permitan identificar y cuantificar los elementos y compuestos que forman parte de esta estructura. Por otro lado, debemos recordar que el esmalte dental se encuentra en un proceso dinámico de liberación y recaptación de iones modulado por el ambiente; así se han utilizado técnicas que permitan cuantificar la pérdida o integración de los iones que forman parte de la HAP como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  en un medio sobresaturado en presencia y ausencia de péptidos. En esta revisión se utilizaron las siguientes técnicas para caracterizar las propiedades químicas de dichos depósitos:

#### - **Espectroscopía de rayos X por energía dispersiva —EDS/EDX/XEDS— Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy**

La espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDX, EDS o XEDS; siglas en inglés para Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) se realiza mediante un detector que suele estar acoplado a un microscopio electrónico (ya sea de barrido o de transmisión). Proporciona un análisis semicuantitativo de los elementos presentes en la superficie de una muestra y el mapeo posicional general en ella. Aquí un haz de electrones de alta energía es bombardeado en una muestra y los rayos X emitidos por la muestra son recolectados por un espectrómetro de dispersión de energía. La energía de los rayos X generados es característica de la estructura atómica del elemento desde el que se emite. El haz de electrones se escanea a

través de la muestra para verificar la uniformidad espacial y la homogeneidad de los elementos detectados <sup>38</sup>.

En remineralización de esmalte se ha utilizado para la identificación de los elementos constitutivos de la superficie y es particularmente útil para determinar la relación atómica característica entre Ca y P de diversas fases minerales; con esta herramienta se puede identificar la similitud química entre hidroxiapatita estequiométrica, hidroxiapatita característica del esmalte sano y el material neoforado.

- **Electrodos selectivos de iones —ISE— (Ion-Selective Electrodes)**

Los electrodos selectivos de iones (ISE; Ion-Selective Electrodes) son sensores electroanalíticos en los que la señal depende de la actividad de iones en una solución y tienen cierto grado de selectividad para iones específicos. Algunos sistemas ISE cuentan con dos o más membranas para identificar un rango más amplio de especies iónicas.<sup>39</sup>

El uso del ISE en remineralización de esmalte se puede realizar de manera indirecta; las muestras se mantienen en una solución en contacto con el electrodo y las diferencias en las concentraciones de calcio y fosfato indican la liberación u obtención de estos iones en la muestra.

- **Espectroscopía de Emisión Óptica con Acoplamiento Inductivo de Plasma —ICP-OES— (Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy)**

Esta es una técnica dinámica de análisis multielemental capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica. Las muestras son introducidas en forma líquida, transformadas mediante un nebulizador en un aerosol y excitadas mediante un plasma de argón <sup>40</sup>. Gracias a la excitación mediante el plasma de argón pueden ser identificados y medidos mediante un espectroscopio óptico.

El uso de esta técnica permite identificar y medir casi todos los elementos de la tabla periódica, en concentraciones desde  $\mu\text{g/l}$  a  $\text{mg/l}$  en cuestión de minutos. <sup>41</sup>

- **Mapeo elemental por microanálisis con sonda de electrones —EPMA— (Electron Probe Micro-Analysis)**

El microanálisis de sonda electrónica se utiliza para el análisis cuantitativo de la composición elemental de especímenes sólidos a escala micrométrica. El método utiliza el bombardeo de la muestra por electrones keV para excitar los rayos X característicos de la muestra, que luego se detectan mediante el uso de espectrómetros de dispersión de longitud de onda. Se pueden analizar elementos con número atómico mayor al del litio y concentraciones de hasta 100 ppm. Este tipo de análisis también permite el mapeo de la distribución espacial de distintos elementos en muestras sólidas<sup>42</sup>.



## - **Técnicas de espectroscopía vibracional**

La espectroscopía vibracional (Infrarroja y Raman) involucra el estudio de la vibración de las moléculas de la muestra que se quiere estudiar para identificar grupos funcionales. Las bandas vibracionales de infrarrojo y Raman son caracterizadas por su frecuencia, intensidad y forma. Ya que los niveles de energía vibracional son únicos para cada molécula, el espectro obtenido representa una “huella digital” para cada molécula <sup>43</sup>. Ambas técnicas (IR y Raman) son complementarias aunque algunas vibraciones aparecen en al usar cualquiera de las técnicas; en general, Raman es mejor para la identificación de vibraciones simétricas en grupos no polares mientras que IR suele ser superior en la identificación de vibraciones asimétricas en grupos polares <sup>43</sup>.

### - **Espectroscopía infrarroja**

La espectroscopía infrarroja mide las transiciones entre niveles de energía vibracional en las moléculas como resultado de la absorción de radiación infrarroja (IR)<sup>43</sup>.

Este tipo de espectroscopía se ha utilizado para determinar la razón entre la fase cristalina y la fase amorfa en polímeros. Las bandas obtenidas de este análisis permiten encontrar el índice de cristalinidad de una muestra determinada <sup>44,45</sup>.

En el esmalte se han reportado espectros a diferentes temperaturas para su caracterización. En las espectroscopías obtenidas a partir de esmalte sano se pueden encontrar bandas características de  $\text{PO}_4^{3-}$  (1090–1032, 960, y 600–500  $\text{cm}^{-1}$ )  $\text{OH}^-$  (633 $\text{cm}^{-1}$ ) y de carbonato (1550, 1460, 1445, 1415 y 870  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>45</sup>

### - **Espectroscopía RAMAN**

La espectroscopía Raman, es un evento inelástico de dispersión de luz; aquí el fotón incidente es de mucho mayor energía que el estado cuántico vibracional y pierde parte de su energía ante la vibración de la molécula de estudio y se dispersa como un fotón con frecuencia reducida.

### - **Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X**

En este tipo de espectroscopía, los electrones dentro de una muestra absorben fotones con una energía dada y después se desprenden de esta, el análisis de la energía cinética de los electrones emitidos por la superficie ofrece información sobre los estados electrónicos de los átomos en la superficie analizada <sup>46</sup>. El uso de esta técnica permite el estudio de una superficie no mayor a 10 nm, con lo que se limita a las capas de cristales neoformados cuando se estudia remineralización de esmalte.

- **Técnicas de análisis de propiedades físicas.**

El esmalte posee cualidades físicas que sufren cambios cuando se ve alterada su composición, tal es el caso de algunas propiedades ópticas o la capacidad con la que permiten el paso de rayos-X. Por lo cual, se han desarrollado técnicas que permiten evaluar la integridad del esmalte a partir de los cambios en su densidad/grado de mineralización.

- **Microradiografía transversal**

La microradiografía transversal emplea rayos X sobre cortes muy delgados del esmalte para obtener imágenes, donde es posible calcular la densidad mineral al emplear una cuña de aluminio (de radiodensidad conocida) con lo que se calibra y compara en la escala de grises. Mediante este método se puede calcular la profundidad de una lesión, pérdida y contenido mineral. Los resultados son después analizados a través de un software especializado<sup>47</sup>.

- **Microtomografía computarizada — $\mu$ CT— (Micro Computed tomography)**

La microtomografía computarizada ( $\mu$ CT; Micro Computed tomography o XMT; X-ray Microtomography) no es más que una versión más pequeña de los tomógrafos computarizados de aplicación clínica, esta versión miniatura permite una resolución en el orden de 2  $\mu$ m. Para llevar a cabo este análisis, se emplea radiación monocromática que arroja resultados cuantitativos mediante el coeficiente de atenuación lineal registrado a través de una muestra; gracias a que el contenido mineral representa >99% de atenuación en el esmalte se puede calcular la pérdida mineral de manera muy certera<sup>48</sup>.

- **Autofluorescencia laser**

Este método de análisis (también llamado fluorescencia inducida por láser) emite un haz de luz de longitud de onda conocida, con lo que ciertos materiales emiten radiación a una longitud de onda distinta<sup>49</sup>. En el esmalte la diferencia en la intensidad de una longitud de onda específica puede indicar desmineralización.

- **Radiometría fototérmica y luminiscencia —PTR-LUM— (Photothermal Radiometry & Modulated Luminescence)**

PTR-LUM combina la tecnología de radiometría fototérmica (PTR; Photothermal Radiometry) y luminiscencia modulada (LUM; modulated luminescence) para la identificación y monitoreo de lesiones cariosas.

En PTR un haz de energía (usualmente un láser) de intensidad modulada a cierta frecuencia se hace incidir sobre la muestra, el flujo de calor resultante gracias a la energía óptica absorbida en el material es un proceso de difusión y produce un aumento de la temperatura (distribuida espacialmente) a lo que se llama “onda térmica”. Esta distribución de temperatura genera una emisión infrarroja que se usa para examinar la muestra. La información dada por esta técnica permite conocer características de muestras opacas hasta una profundidad de varios milímetros<sup>50</sup>.

El término luminiscencia se refiere al proceso en el que se produce luz cuando una fuente de energía origina una transición electrónica de un estado base a un estado excitado. En el esmalte, el cambio en la luminiscencia suele indicar porosidad aumentada en las lesiones cariosas cuando se compara con esmalte sano<sup>50</sup>.

- **Fluorescencia cuantificable emitida por luz —QLF— (Quantitative Light-induced Fluorescence)**

Los cambios en la fluorescencia pueden ser cuantificados y medidos, lo que ofrece un método diagnóstico no invasivo. A través de un equipo que emite una luz mediante un LED, se simula la fluorescencia emitida por el esmalte, esta se captura por un receptor y es procesada y analizada para determinar la profundidad de la lesión (QLF son las siglas en inglés para fluorescencia cuantificable emitida por luz [Quantitative Light-induced Fluorescence]).<sup>51</sup>

- **Microscopía confocal laser**

La microscopía confocal láser permite realizar un análisis de las muestras mediante fluorescencia, por otro lado la imagen es obtenida solo en el plano focal y el ruido resultante del grosor de la muestra es eliminado, esto permite la evaluación del área y profundidad de lesiones cariosas<sup>52</sup>.

- **Microscopía de luz polarizada**

La microscopía de luz polarizada es una técnica que utiliza filtros polarizados para obtener información óptica específica de una muestra<sup>53</sup>

Este tipo de microscopía ha sido utilizada para evaluar remineralización y se basa en el principio de que la luz se difracta positivamente al pasar por materiales porosos y negativamente al pasar por materiales cristalinos con lo que se puede distinguir esmalte sano y desmineralizado.<sup>54</sup>

- **Técnicas de caracterización cristalina.**

El estudio del esmalte y la intención de regenerar este tejido tan especial, se han visto limitados por la cantidad de factores que lo hacen único; más allá de su forma y/o composición elemental, los cristales deben poseer una repetición ordenada y específica de sus iones para formar HAP; la identificación de la fase mineral puede realizarse mediante diversas técnicas como las descritas a continuación:

## - **Difracción de Rayos X —XRD— (X Ray Diffraction)**

Se trata de una técnica no destructiva utilizada para la caracterización de materiales cristalinos. Provee información sobre la fase mineral, orientación de los cristales, grado de cristalinidad o identificación de defectos presentes en la estructura cristalina. Los picos de difracción se producen por interferencia constructiva desde un rayo monocromático de rayos-X dispersados en distintos ángulos de cada grupo de planos de red en una muestra. La intensidad de los picos es determinada por las posiciones atómicas dentro de los planos de red. Con ello el patrón de difracción de rayos-X (XRD) es una huella digital de los arreglos atómicos repetidos en cierto material.<sup>55</sup>

Además, el análisis de XRD nos permite obtener información detallada del porcentaje de cristalinidad, dimensiones de los parámetros de red cristalina, micro tensión cristalina, orientación de los cristales y la posición de los átomos y sitios de ocupación/reemplazo atómico<sup>56</sup>. Una técnica alternativa para el análisis de XRD tradicional es la difracción de rayos X de haz rasante o de ángulo bajo (Grazing Incidence XRD, GIXRD); en esta, el haz de rayos x incide en un ángulo casi paralelo al de la muestra con el objeto de analizar películas delgadas. En el caso del esmalte dental y el proceso de remineralización, esta técnica suele ser utilizada para limitar el análisis a las capas de reciente mineralización de tal manera que solo se analicen los cristales neoformados<sup>57</sup>.

## - **Difracción electrónica de área selecta —SAED— (Selected Area Electron Diffraction)**

La difracción de electrones de área selecta (SAED; Selected Area Electron Diffraction) consiste en la observación del patrón de puntos de difracción obtenidos en TEM a partir de una partícula orientada aleatoriamente, dicho patrón indica que el material es cristalino<sup>58</sup>. Esta técnica se utiliza en el estudio del esmalte para conocer la fase mineral, la orientación y organización de los cristales (parámetros que determinarán las características físicas y mecánicas del esmalte)<sup>59</sup>.

### • **Técnicas de caracterización mecánica**

El esmalte no es solo un tejido duro que recubre la corona de los dientes; pues como se mencionó, debe cumplir ciertas funciones mecánicas para soportar las fuerzas de masticación y el desgaste generado por el contacto con materiales de restauración similares o más duros que este. Uno de los objetivos primordiales de la formación de depósitos con la ayuda de péptidos, es que presenten propiedades mecánicas iguales o muy cercanas a las del esmalte sano. Para evaluar estas propiedades se pueden realizar diversas pruebas como las que a continuación se describen.

## - **Análisis de Dureza**

Existen distintos tipos de análisis de dureza como lo es la prueba de Knoop, de Vickers y la prueba de nanoindentación. La diferencia entre estas pruebas radica en la forma de la punta

con la que inciden las muestras, de tal manera que los resultados se reportan según el estudio realizado.

- **Análisis de módulo elástico**

El módulo elástico es una cualidad muy importante para evaluar cuando la intención es remineralizar el esmalte perdido; ya que, el esmalte tiene una resistencia importante a las fracturas, lo que le permite no solo resistir las constantes fuerzas de masticación sino también impactos sin romperse. El estudio de nanoindentación también ofrece información sobre el módulo elástico aumentando la fuerza de carga gradualmente hasta la fractura del material.

- **Análisis de emisión acústica al rasgado**

La prueba de última emisión acústica al rasgado suele utilizarse en películas delgadas para encontrar fallos en la estructura o para localizar el estrés generado por estos fallos. Esta técnica permite identificar el momento de última emisión acústica cuando se aplica una carga y se interpreta como la fuerza necesaria para separar las interfases o fuerza de adhesión.<sup>60</sup>

## **Planteamiento del problema y Justificación**

Debido a la composición acelular y la nula presencia de proteínas en la estructura del esmalte maduro, los cristales de HAP perdidos durante el trauma o por disolución son imposibles de recuperar de manera natural. Como resultado del daño irreversible ocasionado por la caries o la erosión del esmalte dental, se ha observado un proceso de desmineralización que se evidencia como una lesión de mancha blanca que con el transcurso del tiempo puede dar lugar a una cavidad que pone en riesgo la integridad de otros tejidos dentales. Si bien, los tratamientos convencionales para prevenir y detener la progresión de las lesiones de mancha blanca incluyen el uso de fluoruros en pastas, enjuagues, barnices e incluso el empleo de materiales como selladores o resinas fluidas; aún no se ha alcanzado el éxito terapéutico deseado. Por lo tanto, existe la necesidad de estudiar nuevas alternativas mediante la regeneración de los cristales que constituyen el esmalte. Hasta la fecha, se han desarrollado algunos sistemas biomiméticos que contienen nano-apatitas o diferentes moléculas orgánicas que podrían ser de gran utilidad para alcanzar la remineralización del esmalte. Uno de los principales enfoques que ha tomado gran relevancia es el empleo de péptidos bio-funcionales derivados, algunos de ellos, de proteínas implicadas en el proceso de biomineralización. El empleo de péptidos biofuncionales surgió a partir de la identificación de motivos específicos que juegan un papel clave en la formación del esmalte o en la nucleación y/o crecimiento de HA. Hoy en día, existe una gran cantidad de estudios con varias secuencias polipeptídicas y que han demostrado resultados prometedores con diferentes metodologías y técnicas de estudio, y donde su eficiencia clínica aún no se ha demostrado o sigue en desarrollo. En este trabajo, se realizó una revisión exhaustiva de la literatura para describir los péptidos que han sido utilizados como posibles agentes remineralizantes, con capacidad de formar y regular el crecimiento de cristales de hidroxiapatita in vitro; así como también analizar las diferentes técnicas de caracterización empleadas en las diferentes estrategias metodológicas. Los resultados nos permitieron evidenciar la eficiencia que han mostrado cada uno de los diferentes péptidos empleados, así como también determinar aquellas técnicas de caracterización necesarias para verificar que el depósito formado logra mimetizar la morfología y las características propias del esmalte humano.

# Objetivos

## Objetivo General

Analizar y describir el uso de péptidos como agentes remineralizantes sobre lesiones de tipo mancha blanca en muestras de esmalte dental humano.

## Objetivos Específicos

- Identificar los péptidos que han demostrado promover la formación de depósitos minerales sobre lesiones de mancha blanca en muestras de esmalte dental humano.
- Describir la estructura de los depósitos minerales formados por el efecto de los péptidos empleados.
- Analizar las técnicas empleadas para la caracterización de los depósitos minerales formados por péptidos que han demostrado poseer la capacidad remineralizante sobre lesiones de tipo mancha blanca en esmalte dental humano.

## Metodología

### Pregunta de revisión

Con el objeto de realizar una búsqueda eficiente y eficaz de estudios relacionados con remineralización utilizando péptidos y diseñó una pregunta de revisión con el formato PICO para delimitar los estudios a ser incluidos en la revisión:

Participantes: Muestras de esmalte dental humano desmineralizadas

Intervención: Tratamiento de la superficie del esmalte con péptidos.

Outcome (desenlace) Principal: Formación de depósitos mineralizados sobre la superficie tratada.

La pregunta de revisión utilizada para la búsqueda y recolección de artículos fue:

**¿Cuáles son las características físicas y químicas de los depósitos minerales formados por péptidos utilizados para remineralización de lesiones de mancha blanca en esmalte dental humano?**

### Criterios de selección

Para la identificación y recopilación de estudios que serían incluidos en esta revisión se delimitó el tipo de estudios a experimentales *in vitro*, donde se evaluara la morfología y las características físicas, químicas o mecánicas de los depósitos formados sobre muestras de esmalte humano con lesiones de tipo mancha blanca (*white spot lesion* WSL por sus siglas en inglés) ya sea naturales o creadas artificialmente por cualquier método.

Para la medición y comparación del resultado principal se tomó en cuenta el análisis de la morfología de los depósitos formados sobre la superficie mediante microscopía electrónica de barrido.

Para la medición y comparación de los resultados relacionados con los objetivos secundarios se consideró:

1. Identificación de estructuras que contengan los elementos Ca, P, y O
2. Identificación de depósitos que contengan fosfato de calcio y grupos hidroxilo
3. Identificación de las características cristalográficas de los depósitos
4. Identificación de las fases minerales de los cristales
5. Identificación de las características mecánicas de los depósitos.

Los criterios de exclusión incluyeron muestras de esmalte dental no humanas, tratamiento con proteínas de tamaño completo o de métodos que no implican el uso de péptidos.

### **Estrategia de búsqueda**

La búsqueda se llevó a cabo desde el 26 de marzo del 2021 en los principales buscadores de literatura médica incluyendo MEDLINE (a través de Pubmed), LILACS, SciELO, Ovid, Web of Science, Google académico, Academic Search Ultimate, Applied Science And Thecnology Source Ultimate, CINAHL with full text, Dentistry & Oral Sciences Source, E-Journals, MedicLatina (a través de EBSCO) y TESIUNAM.

La búsqueda se realizó considerando la literatura blanca (bases de datos indexadas) y gris (bases de datos no indexadas como tesis, tesinas, resumen de conferencia) utilizando preferentemente términos estandarizados de búsqueda (MeSH, Emtree, DeCS), "Dental Enamel", "Esmalte dental", "Peptides", "Péptidos", "Tooth Remineralization", "Remineralización Dental", estos parámetros de búsqueda se limitaron con los términos booleanos AND, OR, NOT para incluirlos en esta revisión.

Una vez que se identificaron los artículos limitados por los parámetros de búsqueda antes mencionados, se seleccionaron los estudios mediante la lectura de los títulos y resúmenes por parte de dos investigadores cegados entre sí.

A partir de esta primera selección, se obtuvieron los datos de aquellos trabajos que ayudaron a responder la pregunta de investigación planteada al inicio de esta revisión.

### **Extracción y análisis de datos**

La extracción de datos se llevó a cabo por dos investigadores independientes y fue recolectada en una hoja de cálculo describiendo autores, año de publicación, péptido(s), y hallazgos. Las diferencias entre los investigadores fueron resueltas por un tercero independiente y cegado.

Para tener un mejor entendimiento de los métodos y resultados de cada estudio, se evaluó el riesgo de sesgo para los artículos seleccionados utilizando la herramienta RoB-II incluida en el software Rev-Man 5 por dos investigadores independientes cegados entre sí. Las diferencias entre los investigadores fueron resueltas por un tercero independiente y cegado.

La descripción y análisis de los datos fue de manera cualitativa, con la finalidad de comparar los parámetros empleados y los resultados obtenidos en cada estudio.

## Resultados

### Resultados de la búsqueda.

La búsqueda de estudios arrojó 529 resultados, de estos 140 fueron seleccionados para su lectura en extenso después de eliminar aquellos que no cumplían con los criterios de inclusión establecidos para esta revisión después de la lectura de títulos y resúmenes. Posteriormente se llevó a cabo la lectura del cuerpo completo de cada uno de los registros y se eligieron 54 estudios para su evaluación de riesgo de sesgo, extracción y análisis de datos. (Figura 5)

Los 54 estudios experimentales in vitro seleccionados utilizaron muestras de esmalte dental humano (dos de ellos de dientes primarios Al-Batayneh, et al. y Tulumbaci et al.<sup>54,61</sup> y evaluaron la capacidad de remineralización de distintos péptidos.

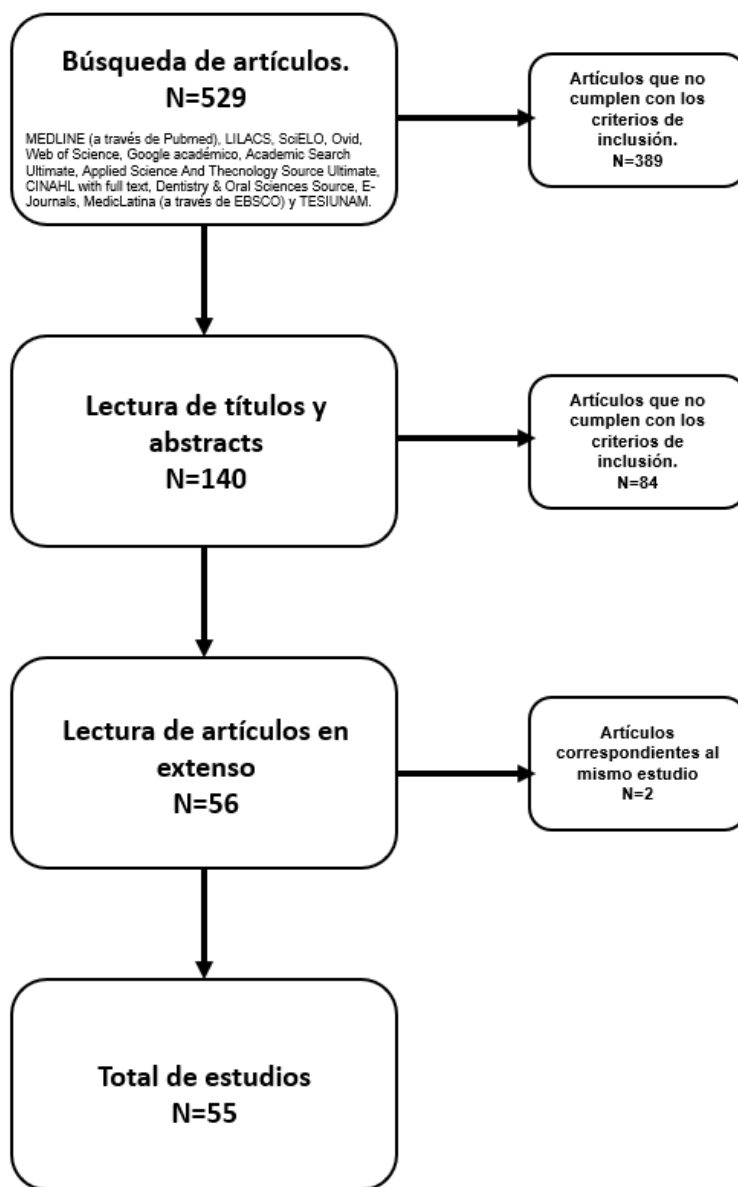


Figura 5. Diagrama de flujo de la identificación y selección de artículos para esta revisión



## Evaluación del riesgo de sesgo

Se realizó la evaluación del riesgo de sesgo para cada artículo utilizando la herramienta ROB incluida en el software RevMan 5, el uso de esta herramienta se modificó para la evaluación de estudios *in vitro*. El resultado de la evaluación por artículo se muestra en la Figura 6 y un resumen en la Figura 7

	Blinding of participants and personnel (performance bias)	Blinding of outcome assessment (detection bias)	Selective reporting (reporting bias)	Other bias
Batayneh 2017	?	?	+	+
Bhat 2012	?	?	+	?
Chung 2012	?	?	?	+
Chung 2013 (3NSS)	?	?	+	+
Chung 2013 (3NSS II)	?	?	?	+
Chung 2013 (NBS)	?	?	-	+
Ding 20	?	?	?	+
Ding 2020 (tuffelin)	?	?	-	+
Dogan 2018	?	?	+	+
ElSayad 2009	?	?	?	?
Fang 2021	?	?	+	+
Hegde 2012	?	?	+	+
Hsu 2009	?	?	?	+
Hsu 2011	?	?	?	-
Jablonski-Momeni 20	?	+	+	+
Jablonski-Momeni 2014	?	?	+	-
Kamal 2018	?	?	+	+
Kamal 2020	?	?	+	+
Keskin 2020	?	?	+	+
Khanduri 2020	?	?	+	+
Kind 2017	?	?	-	+
Kirkham 2007	?	?	+	+
Kucukyilmaz 2017	?	?	+	+
Kwak 2017	?	?	+	+
Lata 2009	?	?	+	+
Li 2014	?	?	-	+
Liu 2018	?	+	+	+
Luo 2012	?	?	+	+
Mukherjee 2018	?	?	-	+
Pai 2008	?	?	+	?
Pirca 19	?	?	+	+
Qamar 19	?	?	+	+
Rai 2019	?	?	+	+
Rajendran 2021	?	?	+	+
Reynolds 1997	?	?	+	+
Savas 2016	?	+	+	+
Silvertown 2017	+	+	?	-
Sindhura 2018	?	?	+	+
Stoleriu 2019	?	?	+	?
Suryani 20	?	?	+	+
Talaat 2015	?	?	+	?
Taranath 2014	+	+	+	?
Tripathi 2021	?	?	+	+
Tulumbaci 2020	+	+	?	+
Üstün 19	?	?	+	+
Wang 20	?	?	+	+
Xiao 2017	?	?	+	+
Yahya, 2020	?	?	+	?
Yang 2017	?	?	+	+
Y Yang 2017	?	?	-	+
Zhang 2016	?	?	+	+
Zhou 2014	?	?	+	+
Zhou 2020	?	?	-	+

Figura 6. Evaluación individual del riesgo de sesgo

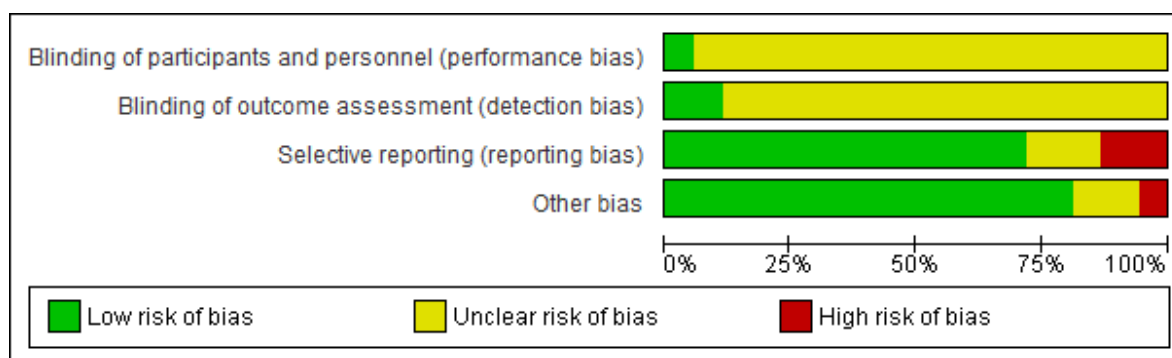


Figura 7. Resumen de la evaluación de riesgo de sesgo

### Dominios de evaluación de riesgo de sesgo.

- **Aleatorización, Ocultación de la asignación y Datos incompletos por desenlace.**

Se omitió la evaluación de dichos dominios por su naturaleza; en este tipo de estudios, la obtención y resguardo de las muestras implica aleatorización, encontramos también que la asignación de grupos no fue reportada en ninguno de los estudios, quizá porque las características de las muestras in vitro no deben tener diferencias entre sí y la medición de los desenlaces (incluso la medición de los parámetros basales) se realiza después de la asignación de grupos; por último, no se reportan pérdidas de muestras probablemente por el ambiente controlado en un laboratorio durante estudios in vitro.

- **Cegamiento de los participantes y personal.**

En esta revisión se evaluó particularmente el cegamiento del personal que aplica la intervención; en este caso solo Taranath y colaboradores<sup>62</sup> y Tulumbaci *et al.*<sup>54</sup> reportaron cegamiento de los investigadores al realizar las intervenciones.

- **Cegamiento de las evaluaciones de los desenlaces.**

El cegamiento de las evaluaciones de los desenlaces solo fue reportado por Jablonski-Momeni en el estudio de 2020<sup>63</sup>, Liu<sup>64</sup>, Savas<sup>65</sup>, Silvertown<sup>66</sup>, Taranath<sup>62</sup> y Tulumbaci<sup>54</sup>. El cegamiento de los evaluadores de los resultados se sugiere para evitar el riesgo de detección y una falsa asociación entre resultados positivos y los grupos tratados con la intervención sugerida.

- **Sesgo de reporte**

El sesgo de reporte se consideró poco claro cuando se reportaban solo tablas o gráficas de resumen y no los resultados individuales según el desenlace (descripción de cada grupo o medias y desviación estándar). Se consideró alto riesgo de sesgo cuando no se encontraban publicados los resultados (tanto de los grupos sometidos a la intervención como de los controles) ya sea en tablas, gráficas de resumen o detalladamente.

- **Otro tipo de sesgos.**

Para este dominio se consideró riesgo de sesgo poco claro cuando no se reportaban conflictos de interés o financiamiento; se considera alto riesgo de sesgo si en el estudio se reportan conflictos de interés (investigadores que pertenecen a casas comerciales o financiamiento por la industria).

### **Péptidos incluidos en esta revisión**

En los 54 estudios encontrados se reportó el uso de 25 péptidos distintos derivados de 8 proteínas y dos péptidos sintéticos. De todos ellos el péptido con más estudios realizados fué un péptido natural derivado de la leche denominado fosfopéptido de caseína, seguido del péptido sintético P<sub>11-4</sub> con capacidad de autoensamblarse para formar andamios que dirigen el crecimiento de cristales. El resto de los péptidos incluyen principalmente péptidos derivados de amelogenina con algunas modificaciones desde la adición o cambio de un solo residuo, a su conjunción con otros péptidos para crear péptidos quiméricos, se han probado otros péptidos naturales de orígenes distintos al dental como el ácido poli-gamma-glutámico (PGGA), el uso del péptido antimicrobiano H5 y péptidos derivados de la estaterina de la película dental entre otros. Todos los péptidos reportaron la nucleación y crecimiento de estructuras minerales con características químicas y cristalográficas similares a las de la hidroxiapatita (HAP) estequiométrica. El resumen de los péptidos encontrados y sus características principales se resume en la tabla 1.

<b>Tabla 1. Resumen de péptidos y sus características</b>			
<b>Origen Natural</b>			
<b>Péptido/ Secuencia</b>	<b>Origen</b>	<b>Característica principal</b>	<b>Referencias</b>
CPP/ pSpSpSEE	Proteína de la leche: Caseína	Estabilización de iones calcio y fosfato, induce remineralización, reserva de iones calcio y fosfato, buffer en pH ácido	61,62,67–69, 71–76,78, 80–82, 85,86
PGGA/ repetición de residuos D	Derivado de la fermentación de los granos de soya	Alta afinidad por la hidroxiapatita, capacidad de absorber Ca <sup>2+</sup> inhibe la disolución de cristales de hidroxiapatita	92
LRAP/ MPLPPHPGHPGYINFSYEVLT LKWYQNMIRHPSLLPDLP LEAWPATDKTKREEVD	Splicing alternativo de Amelogenina	Puede tener propiedades similares a las de amelogenina: capacidad de formar nanoesferas, e interactuar con la hidroxiapatita	109
C-AMG o péptido “B”/ LEAWPATDKTKREEVD	Extremo carboxilo terminal de amelogenina	Capacidad de remineralización	69,105

3DSS/ DSS8	Secuencias repetitivas dentro de la estructura de la fosfoproteína dentinaria	Parece tener una alta afinidad de unión a la hidroxiapatita y la capacidad de reclutar iones calcio y fosfato	97–99
TDP/ DRNLGDSLHRQEI	Tuftelina	Contiene un dominio de autoensamblaje (C-terminal) y un dominio aniónico y de unión a Ca (N-terminal)	103
H5/ DSHAKRHHGY KRKFHEKHHSHRGY	Péptido antimicrobiano salival "H5"	Capacidad de unirse a la HAP	93
<b>Origen natural con modificaciones</b>			
MPP3/ PGEKADRAEKADRA	Inspirado en Amelogenina	Péptido diseñado con cuatro pares de aminoácidos con cargas opuestas lo que podría reclutar iones $Ca^{2+}$ y $PO_4^{3-}$ .	54
SpH5/ pS-DSHAKRHHGY KRKFHEKHHSHRGY	Fosforilación de "H5"	Capacidad de unirse a la HAP, su fosforilación podría ayudar a reclutar iones $Ca^{2+}$	93
NSS/3NSS/ 5NSS	Basado en fosfoproteína dentinaria (Intercambio de los residuos D por N en DSS )	El intercambio por N resultó en una mejora en la dureza	101
DpSpSEEKC	Secuencia de la proteína Estaterina (se agregó un residuo C para permitir su unión con otras macromoléculas)	Alta afinidad a fosfato de calcio	96
Péptido 7 o SAP peptide/ DDDEEK	Secuencia de la proteína Estaterina (intercambio de los residuos fosforilados por D)	Alta afinidad a fosfato de calcio	64, 94, 95

shADP5/ SYENSHSQAINVDRT	Versión corta del péptido derivado de amelogenina "ADP5"	Facilita la formación de una capa mineral sobre dentina radicular humana.	107
mLRAP/ PYPSYGYEPMGG WMPLPPHPGH- PGYINFSYEVLTPLKWY QNMIRHPSLLPD LPLEAWPATDK	Modificación de LRAP (se agregó un motivo de triple tirosina)	Promueve y dirige el crecimiento de cristales de HAP	104
NAA/ SFGSGFGGGYE $\rho$ SNE $\rho$ S	Basado en proteínas no-amelogeninas	Asociado a remineralización	104
<b>Quiméricos</b>			
Péptido "A"/ SVSVGMKPSRPGGGGS LEAWPATDKTKREEVD	Unión de la porción C- terminal de la amelogenina y un péptido de unión a HAP "HA6-1)	Dirige el crecimiento de cristales y tiene alta afinidad por HAP	105
P26/ MPLPSYEVLTPLKW PSTDKTKREEVD	Unión de secuencias en la N-y C- terminal de la amelogenina	Promueve y dirige el crecimiento de cristales de HAP	112
P32/ MPLPSYEVLTPLKW PVHPMQPSTDKTKREEVD	Unión de secuencias en la N-y C- terminal de la amelogenina y un motivo de repetición de P	Promueve y dirige el crecimiento de cristales de HAP	112
(QPA) <sub>4</sub> + TKREEVD	Unión de 4 repeticiones de QPA y la C-terminal de amelogenina	Capacidad de autoensamblarse y dirigir crecimiento de cristales	110
QP5/ QPYQPVQPH QPMQPQTKREEVD	Unión de 5 repeticiones de motivos de prolina y la C-terminal de amelogenina	Capacidad de autoensamblarse y dirigir crecimiento de cristales	111

Sintético			
P <sub>11-4</sub> / QQRFEWEFEQQ	Péptido sintetizado en laboratorio	Capacidad de autoensamblaje	63,65,88– 91,66, 70,76, 79,83, 85–87

## Fosfopéptido de Caseína

Este péptido fue el más reportado (22 artículos) y el estudio más antiguo lo realizó Reynolds en 1997<sup>67</sup>. Se trata de una secuencia derivada de una proteína proveniente de la leche que, desde la década de 1950, era considerada como un agente cariostático importante. Investigaciones posteriores demostraron que la caseína tiene la capacidad de estabilizar los iones calcio y fosfato y con ello inducir la remineralización de lesiones incipientes. El fosfopéptido de caseína (CPP) se obtiene de la digestión trípica de la caseína y se ha utilizado junto con fosfato de calcio amorfo (ACP) en estudios *in vitro* e *in vivo* para promover la remineralización del esmalte.

Se han diseñado distintos métodos para hacer disponible el complejo CPP-ACP, que funciona como una reserva de iones (calcio y fosfato) para lesiones cariosas iniciales, funcionando como un sistema buffer en pH ácido e incrementando la solubilidad de las sales de calcio. También se ha probado este complejo en combinación con productos fluorados.

Al ser el péptido más estudiado por diferentes grupos de investigadores, la caracterización de los depósitos formados por el fosfopéptido de caseína se ha corroborado mediante diferentes técnicas que incluyen SEM/EDS, AFM, mapeo elemental por microanálisis con sonda de electrones, micro-radiografía transversal, microtomografía computarizada, detección de auto-fluorescencia laser, QLF, XRD, y pruebas mecánicas como el ensayo de dureza de Vickers y ensayos de nanoindentación.

Estudios realizados por Suryani, Wang, Sindhura, Pai, Khanduri, Hegde, Keskin, Rajendran, Tripathi y Talaat reportaron que muestras de esmalte humano tratadas con el complejo CPP-ACP presentan la formación de depósitos minerales que cubrían parcialmente la superficie del esmalte y reducían el tamaño de los poros generados por el proceso de desmineralización; sin embargo, las capas de remineralización no eran significativas y los cristales solían formarse de manera dispersa y desordenada<sup>68-77</sup>. El análisis químico de la superficie de las muestras realizado mediante EDS reveló que los depósitos tenían un contenido importante de Ca y P, cuya razón molar (Ca/P) podría indicar la formación de cristales de HAP, esto tomando como referencia la composición química de la HAP estequiométrica representada por Ca/P de 1.67<sup>67,69,70,72-76</sup>. Zhou y cols. realizaron mapeo elemental por microanálisis con sonda de electrones y demostraron que el tiempo es un factor determinante para la recuperación de la razón molar Ca/P al valor estándar de HAP estequiométrica (1.67). En este mismo estudio se evaluó la rugosidad de la superficie mediante AFM y encontraron una disminución importante dependiente del tiempo de incubación, lo que podría indicar un crecimiento cristalino más ordenado y con ello una menor probabilidad de colonización bacteriana. Además, al analizar la estructura cristalina de los depósitos mediante XRD encontraron patrones de difracción

semejantes a los de la HAP estequiométrica y resaltan el crecimiento del tamaño del cristal dependiente del tiempo de incubación después del tratamiento con CPP/APC <sup>78</sup>

Reynolds, mediante estudios de micro-radiografía transversal demostró que a mayor concentración de este péptido, mejor era la capacidad para aumentar el porcentaje mineral en volumen<sup>67</sup>. Por otro lado, Üstün y cols. utilizaron  $\mu$ CT para obtener la profundidad de la lesión (mm), densidad mineral ( $\text{g/cm}^2$ ), área de la superficie ( $\text{mm}^2$ ) y volumen ( $\text{mm}^3$ ) con resultados estadísticamente significativos en todos los parámetros cuando se trataban con CPP/ACP<sup>79</sup>.

Las investigaciones realizadas por ElSayad, Batayneh, Üstün, Bhat, Taranath y Pai con la ayuda de sistemas de detección de fluorescencia demostraron la recuperación de esta propiedad en todas las muestras tratadas con CPP-ACP<sup>61,62,71,79-81</sup>. el porcentaje de recuperación la lesión en esmalte fue mucho mejor en aquellas donde se utilizó este péptido en combinación con flúor<sup>61,79,81</sup>.

Las propiedades mecánicas también fueron evaluadas con el uso de este péptido; en el estudio realizado por Zhou se demostró un aumento de la dureza y el módulo elástico relacionado con el tiempo evaluados mediante el ensayo de nanoindentación<sup>78</sup>, mientras que Suryani y Lata demostraron un aumento en la dureza de muestras desmineralizadas y tratadas con CPP-ACP mediante la técnica de Vickers<sup>68,82</sup>.

Los estudios realizados por Kamal y Khanduri donde complementaron el uso de CPP-ACP con otras sustancias como  $\text{NaF}$ <sup>72,83</sup> y el realizado por Keskin con derivados de la matriz del esmalte (EMD; Enamel Matrix Derivative) <sup>74</sup> reportaron disminución de la porosidad y una mejor organización de los cristales formados<sup>72,74,83</sup>. Además, los trabajos realizados por Suryani, Kamal, Yahya y Lata demostraron que las muestras tratadas con CPP-ACP y flúor presentaban mejoras en las propiedades mecánicas cuando se evaluaron mediante la técnica de Vickers<sup>82-86</sup>, sin embargo, los indicadores de dureza no se acercan al esmalte natural(10). Los resultados reportados por Kamal donde combinó el uso de CPP-ACP con un péptido de autoensamblaje P<sub>11-4</sub> y  $\text{NaF}$ , lograron retomar el patrón de “escamas de pescado” característico del esmalte sano<sup>83</sup>.

## **P<sub>11-4</sub>**

El péptido P<sub>11-4</sub> (QQRFEWFEQQ) es una pequeña molécula que tiende a auto-ensamblarse en andamios fibrilares de tamaño nanométrico en respuesta a características específicas del ambiente<sup>87</sup>. El ensamblaje fibrilar de P<sub>11-4</sub> presenta grupos cargados negativamente compuestos por cuatro residuos de ácido glutámico en su superficie, lo que representa un posible sitio de unión de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Simulaciones de dinámica molecular han demostrado que estos sitios de unión se encuentran separados por aproximadamente 9.4 Å —una distancia encontrada entre las columnas de iones calcio en el cristal de hidroxiapatita— de esta manera, las fibras creadas por P<sub>11-4</sub> presentan una superficie que puede imitar a las proteínas de la matriz del esmalte que controlan la deposición y crecimiento de cristales de hidroxiapatita<sup>87</sup>. Al analizar los depósitos formados por este péptido mediante SEM, se encontró un aumento en la densidad de cristales, así como una disminución considerable de poros y defectos en el

esmalte desmineralizado. Sindhura y cols. reportaron “deposición iónica uniforme que se asemeja a la superficie del esmalte natural sugestiva de nucleación de hidroxiapatita”, después de 3 meses del tratamiento con este péptido<sup>70</sup>. Savas, Kirkham y Tripathi utilizaron el sistema EDS acoplado a SEM para realizar el análisis químico de la superficie de las muestras y encontraron razones molares Ca/P de entre 1.67 y 1.95 lo que podría indicar crecimiento de cristales de hidroxiapatita<sup>65,70,76,88</sup>. Los trabajos realizados por Üstün y Kind demostraron la capacidad de remineralización de este péptido mediante  $\mu$ CT<sup>79,87</sup>.

Kamal y cols. probaron el uso de este péptido solo y en combinación con NaF y CPP-ACP+F y reportaron la recuperación del patrón de escamas de pescado (aunque no aclararon si lo encontraron en todos o alguno los grupos tratados con P<sub>11-4</sub>)<sup>83</sup>

Silvertown, Jablonski-Momeni, Kucukyilmaz y Üstün demostraron una disminución en los valores de fluorescencia que podrían indicar caries, determinando que el efecto remineralizante de P<sub>11-4</sub> es mejor después de 4 semanas<sup>63,66,79,89,90</sup>.

Savas y cols. utilizaron microscopía confocal láser para evaluar remineralización. En este estudio tiñeron las muestras con rodamina B y posteriormente se examinaron con un microscopio que utiliza un láser de helio-neón a 532 nm. Los datos que obtuvieron incluían profundidad ( $\mu$ m) y área de las lesiones ( $\text{mm}^2$ ). A 7 días encontraron un mejor efecto remineralizante según los parámetros planteados para P<sub>11-4</sub> pero la evaluación a 30 días no demostró que fuera mejor que el resto de los grupos contra los que se comparó (soluciones fluoradas)<sup>65</sup>.

Kamal, Yahya y Savas evaluaron la microdureza de superficie mediante el ensayo de dureza de Vickers mientras que Stoleriu evaluó la microdureza transversal a distintas profundidades. Los resultados indican una recuperación de la dureza cuando se usaba el péptido P<sub>11-4</sub> que mejoraba con el tiempo o cuando se usaba en conjunto con otras sustancias como NaF y CPP-ACP+F; sin embargo, incluso los mejores resultados —352.36 VHN usando P<sub>11-4</sub>+CPP-ACP+F—están muy lejos de igualar la dureza del esmalte natural (usualmente reportada alrededor de 500 VHN)<sup>65,83,85,86</sup>, más allá de estos resultados, Stoleriu reportó que la dureza fue significativamente menor a la del esmalte sano cuando realizó el ensayo a 25 y 75  $\mu$ m (98.5 y 143.3 VHN respectivamente)<sup>91</sup>

### **Ácido poli- $\gamma$ -glutámico**

El ácido poli- $\gamma$ -glutámico (PGGA) es un producto natural derivado de la fermentación de los granos de soya y tiene una secuencia rica en residuos glutamato, por lo que posee una alta afinidad por la hidroxiapatita del esmalte. El PGGA es un biopolímero biodegradable, no tóxico que ha sido utilizado como vehículo farmacológico y como agente para inmovilización de enzimas, también se ha reportado que tiene la capacidad de absorber  $\text{Ca}^{2+}$  en el intestino, por otro lado, ha demostrado efectividad para inhibir la disolución de cristales de hidroxiapatita en sistemas cíclicos de desmineralización-remineralización<sup>92</sup>.

Mediante un electrodo selectivo de iones Qamar y cols. concluyeron que este péptido podría tener la capacidad de remineralizar, ya que disminuyó la cantidad de iones  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en una solución controlada que mantenía muestras de esmalte tratadas con PGGA. Este análisis



fue complementado con pruebas mecánicas (microdureza transversal; CSMH) donde se encontró que el aumento de la dureza es proporcional a la concentración y que tiene un efecto similar al observado cuando se utiliza NaF<sup>92</sup>.

### **Histatina 5 (H5-sPH5)**

La histatina 5 (H5) es un reconocido péptido antimicrobiano salival (AMP AntiMicrobial Peptide) componente de la película adquirida que ha demostrado la capacidad de adsorberse al esmalte y evitar la colonización de los microorganismos que componen la biopelícula bacteriana. H5 (DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY) *per se* no tiene un efecto bioactivo, sin embargo, Zhou y cols. se basaron en reportes previos donde péptidos fosforilados han mostrado ser eficaces para remineralización de esmalte dental y agregaron una fosfoserina al inicio de la secuencia (fosfoserina-DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY) para promover la atracción de iones Ca<sup>2+</sup> y la unión a HAP. El crecimiento de los cristales de HAP formados por SpH5 se caracterizó mediante FE-SEM y por espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). Al comparar el uso de H5 y su modificación con fosfoserina no se encontraron diferencias significativas en la ganancia de Ca y P en la superficie del esmalte<sup>93</sup>.

### **Péptidos derivados de la estaterina (DpSpSSEKC / DDDEKC o Péptido 7)**

Se trata de péptidos derivados de la estaterina, una fosfoproteína ácida constitutiva de la película adquirida de la saliva. A partir del estudio de la secuencia de 15 residuos de la porción amino-terminal de esta proteína denominados SN15 (DpSpSSEKFLRRIGRFG donde pS representa serina fosforilada) y su análogo SN<sub>A</sub>15 (DDDEKFLRRIGRFG) se demostró que tienen una alta afinidad a la HAP. Estudios posteriores comprobaron que los primeros 6 aminoácidos de la secuencia (DpSpSSEK) son los responsables de esta afinidad gracias a su carga y estructura en  $\alpha$ -hélice<sup>64,94-96</sup>.

Yang Y y cols. añadieron una cisteína a la secuencia (DpSpSSEKC) para favorecer la formación de enlaces disulfuro de tal manera que el péptido tuviera la capacidad de interactuar con otras macromoléculas. Con este péptido modificado realizaron ensayos de remineralización y demostraron mediante SEM la presencia de cristales similares a prismas que cubrían por completo la superficie de la muestra con un tamaño y forma relativamente uniformes; estas observaciones fueron complementadas mediante AFM, revelando un crecimiento ordenado y mediante XRD se encontraron picos de difracción característicos de la HAP. Por otro lado, el ensayo de dureza de Knoop y la prueba de última emisión acústica durante el rasgado demostraron una recuperación de la dureza de más del 91% y con una fuerte adhesión entre el esmalte y los cristales neoformados con el péptido DpSpSSEKC.<sup>96</sup>

En el estudio realizado por Liu y colaboradores sustituyeron las serinas fosforiladas (DpSpSSEKC) con ácido aspártico (D) (DDDEEK) y demostraron que también tiene la capacidad de unirse a la HAP. Con esta modificación, diseñaron una secuencia de 6 aminoácidos cargados negativamente y le agregaron una cola de cisteína para su conjugación con otros materiales (DDDEEK), a la que llamaron péptido-7 (peptide-7). Mediante el análisis de SEM, AFM y XRD se demostró el efecto remineralizante de este péptido, ya que se

encontraron depósitos de cristales con características cristalográficas parecidas a las de HAP estequiométrica, con una morfología plana y compacta que cubría toda la superficie previamente desmineralizada y un grosor aproximado de 1.5µm. Las propiedades mecánicas de los depósitos fueron aceptables, con una recuperación de la dureza mayor al 80% y una mejor fuerza de adhesión a la encontrada por el uso de NaF. En este estudio también realizaron pruebas de adsorción a HAP y ensayos *in vivo* en ratas<sup>64</sup>.

Yang X. y cols. agregaron complejos con ácido tánico (TA; Tannic Acid) y el ion Fe (III) al péptido DDDEEK (al que llamaron SAP; Salivary Acquired Pellicle) para mejorar la atracción de iones calcio y su adsorción a la superficie del esmalte. El ácido tánico es un polifenol natural y el complejo creado con el ion Fe (III) crea un recubrimiento que ha demostrado la capacidad de inducir mineralización en túbulos dentinarios. En este estudio se demostró la capacidad de remineralización de DDDEEK, SAP-TA y SAP-TA/Fe(III) en la superficie del esmalte mediante SEM XRD y AFM donde encontraron crecimiento de cristales ordenados con forma de nanovarillas (SAP-TA y SAP-TA/Fe(III)), aunque en todos los grupos experimentales se demostró crecimiento de cristales con características cristalográficas similares a las de la HAP estequiométrica, el depósito creado por SAP-TA/Fe(III) era el más denso, con mayor grosor (10µm) y menor rugosidad media. Las propiedades mecánicas fueron evaluadas mediante el ensayo de dureza de Knoop y el ensayo de última emisión acústica al rasgado donde el grupo de SAP-TA/Fe(III) fue el que tuvo mejor rendimiento con una recuperación de la dureza del 80%<sup>94</sup>.

Zhang y colaboradores, a través de la capacidad de la cisteína en DDDEEK para formar enlaces, agregaron procianidinas oligoméricas ya que promueven la reparación de la dentina, también estudiaron el efecto de este complejo con la adición del ion Fe(III). Los depósitos formados por este complejo se analizaron con SEM, AFM y XRD y encontraron cristales bien ordenados, con forma de nanovarillas y características de difracción similares a las de la HAP estequiométrica. Los resultados de la prueba de dureza de Knoop indican una recuperación de la dureza menor al 80% (de la dureza del esmalte sano) y los resultados del ensayo de fuerza de adhesión indican una fuerte interacción entre la muestra y los depósitos formados por SAP-OCP/Fe(III)<sup>95</sup>.

### **Péptidos derivados de la fosfoproteína dentinaria (3DSS/8DSS)**

De acuerdo al análisis de la estructura de la fosfoproteína dentinaria, se identificó un motivo de múltiples repeticiones de 3 aminoácidos: Aspartato, Serina, Serina (DSS); este motivo posee una alta afinidad de unión a la hidroxiapatita y tiene la capacidad de reclutar iones calcio y fosfato<sup>97</sup>.

Chung y cols. utilizaron un péptido de triple repetición como el que se encuentra en la fosfoproteína dentinaria (3DSS) y demostraron su efecto remineralizante mediante SEM, AFM y GIXD, con ello encontraron la deposición de minerales que se depositaban en las varillas del esmalte y los espacios interprismáticos por lo que la superficie se veía más lisa después del proceso de remineralización, de cualquier manera los resultados de AFM y GIXD demostraron que la deposición mineral era mejor en el grupo sin tratamiento y que, aunque el patrón de difracción demostró que se trataba de HAP, los cristales que crecieron en el grupo tratado con

3DSS eran más pequeños que los cristales que crecieron en el grupo control (sin tratamiento). Al evaluar las propiedades mecánicas mediante el ensayo de nanoindentación, se demostró que el péptido permite la recuperación de la nanodureza de superficie y el módulo elástico pero los resultados están muy alejados de igualar los parámetros registrados por el esmalte natural<sup>97</sup>.

Por otro lado, Hsu y colaboradores, en un estudio publicado en dos partes, caracterizaron la superficie de muestras de esmalte tratadas con un péptido de 8 repeticiones de DSS (8DSS). Mediante SEM identificaron deposición mineral sobre los prismas del esmalte y los espacios interprismáticos, los resultados del análisis por EDX indican una razón Ca/P muy similar a la de HAP estequiométrica (1.67), pero los patrones de difracción encontrados mediante GIXD indican que se trata de carbonato de calcio y fosfato [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$ ]. Los resultados de AFM y TEM demuestran una superficie lisa y con depósitos minerales que se localizan en la superficie y entre los prismas del esmalte expuestos por el proceso de desmineralización. La dureza y módulo elástico mejoraron con la exposición de las muestras a 8DSS pero no alcanzaron los valores encontrados en el esmalte natural<sup>98,99</sup>.

### **Modificación de péptidos derivados de la fosfoproteína dentinaria (NSS/5NSS/3NSS)**

Hsu, Chung y cols. demostraron la capacidad de remineralización de la secuencia repetitiva DSS, y sintetizaron un péptido donde sustituyeron el ácido aspártico (D) por asparagina (N), demostrando que promovía la recuperación de la dureza del esmalte natural después de haber sido desmineralizado y tratado con este péptido en un medio sobresaturado de calcio y fosfato<sup>100</sup>.

Chung y colaboradores caracterizaron los depósitos formados sobre esmalte desmineralizado con la secuencia repetitiva NSS y con distinto número de repeticiones de esta (NSS, 3NSS y 5NSS); mediante SEM identificaron crecimiento de nanovarillas en todos los grupos (incluido el control sin tratamiento) pero el tamaño de estas fue menor que las encontradas en el control. Los patrones de difracción encontrados mediante GIXD demostraron crecimiento de HAP y las imágenes de TEM indican crecimiento de cristales que no ocupaban toda la superficie del esmalte e incluso poros que no fueron ocupados por los depósitos minerales<sup>100</sup>.

En otro par de estudios el mismo grupo de autores probaron exclusivamente el péptido 3NSS y evaluaron microestructura mediante SEM y hrTEM con lo que describieron el cambio de una superficie porosa a una más lisa con crecimiento de cristales tanto en la superficie de las nanovarillas preexistentes del esmalte como en los poros creados por el proceso de desmineralización, los patrones de difracción mostrados mediante GIXD y SAED comprobaron que se trataba de HAP, por otro lado el análisis mediante FTIR demostraba bandas cercanas a 1073, 1019 y 958  $\text{cm}^{-1}$  características de  $\text{PO}_4^{3-}$  pero también bandas a 1542, 1492, 1457 y 874  $\text{cm}^{-1}$  características de  $\text{CO}_3$  lo que indicaría que el mineral encontrado debe ser HAP carbonatada. Por último las propiedades mecánicas medidas a través del ensayo de nanoindentación indicaron un aumento de dureza y módulo elástico de las muestras después de ser tratadas con 3NSS pero siguen siendo resultados muy alejados de los parámetros del esmalte sano<sup>101,102</sup>.

## **Péptido derivado de Tuftelina (TDP)**

La tuftelina es una proteína sintetizada por los ameloblastos en etapas tempranas del desarrollo del esmalte y se encuentra en altas concentraciones en la unión dentina-esmalte, sitio donde se inicia la mineralización de este tejido. Esta proteína contiene un dominio de autoensamblaje cerca de la porción carboxilo terminal y un dominio aniónico de unión a calcio cerca de la porción amino terminal (residuos 125-137) que puede estar asociado con la cristalización inicial del esmalte.

Ding y colaboradores sintetizaron un péptido derivado de la tuftelina (TDP; Tuftelin derived Peptide) formado por la secuencia DRNLGDSLHRQEI. En este estudio utilizaron microradiografía transversal y demostraron que tiene un efecto importante disminuyendo la profundidad de lesiones artificiales en muestras de esmalte. También utilizaron microscopía de luz polarizada y encontraron que existe una clara capa de remineralización muy similar a la encontrada en el grupo control positivo (NaF)<sup>103</sup>.

## **Péptido sintético análogo de proteínas no amelogeninas (NAA)**

Las proteínas no amelogeninas son biomoléculas importantes en la nucleación de los cristales de HAP durante la amelogénesis. Se ha demostrado que estas proteínas interactúan con la amelogenina a través de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y a su vez, que la secuencia SFGSGFGGGY tiene la capacidad de imitar a GlcNAc

Fang y cols. diseñaron un análogo no-amelogenina uniendo la secuencia SFGSGFGGGY y un péptido con serinas fosforiladas (*E<sub>p</sub>SNE<sub>p</sub>S*), el péptido resultante fue usado después de un proceso de aminoacetilglicosilación del extremo amino terminal, con lo que obtuvieron la secuencia final GlcNAc-SFGSGFGGGY-*E<sub>p</sub>SNE<sub>p</sub>S*; así, examinaron los cristales regenerados por acción de este péptido solo y en combinación con mLRAP —un péptido derivado de amelogenina el que se le agregó un motivo de tres tirosinas—. El análisis de la morfología de superficie se llevó a cabo utilizando SEM donde se no se encontró formación de cristales cuando solo se usaba NAA pero la combinación con mLRAP demostró la formación de una estructura cristalina con un diámetro medio de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , que tenía una apariencia similar al esmalte natural. Los haces paralelos de numerosos cristales en forma de aguja se fusionaron y se empaquetaron densamente en la superficie, lo que resultó en una estructura similar a un prisma de esmalte. La zona de transición demuestra un crecimiento epitaxial y la micrografía transversal mostró que la capa recién regenerada estaba estrechamente unida al esmalte natural subyacente, y los ejes largos de los cristales recién regenerados correspondían al eje C cristalográfico de los cristales HAP subyacentes. El espesor de la capa de esmalte regenerada fue de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , con características bien organizadas y uniformes y no se encontró ningún límite evidente en la interfaz. El análisis usando XRD demostró que la fase mineral formada por el uso de NAA y mLRAP se trataba de HAP con picos intensos correspondientes a 002 y 004 lo que indica un crecimiento bien ordenado, paralelo y con dirección del eje c, por otro lado, el análisis mediante FTIR confirmó el hallazgo de una estructura típica de HAP con la identificación de la banda  $\nu_3$  (997-1124  $\text{cm}^{-1}$ ) y  $\nu_4$  (600 y 554  $\text{cm}^{-1}$ ) correspondientes a  $\text{PO}_4$ . Por último, los resultados del análisis de

dureza de Vickers no demostraron diferencias estadísticas significativas entre la dureza de esmalte sano y las muestras tratadas con NAA y mLRAP <sup>104</sup>.

### **Péptidos derivados de amelogenina**

La amelogenina es la proteína principal de la matriz extracelular durante la formación y desarrollo del esmalte, por ello, se han tratado de identificar y aprovechar secuencias que pudieran tener un efecto remineralizante en el esmalte maduro.

#### **C-AMG/Péptido “B”**

Wang y colaboradores diseñaron una estrategia basada en el uso de un péptido sintético que imita la porción carboxilo-terminal de la amelogenina o C-AMG (LEAWPATDKTKREEVD). El uso de este péptido se combinó con lisozima transitada de fase (PTL, phase transited lysozyme) con la intención de crear un andamio tipo amiloide para dirigir el crecimiento ordenado de los cristales de hidroxiapatita. En este estudio describieron con ayuda de SEM que, con el uso de C-AMG la morfología porosa del esmalte no cambió significativamente, y las muestras mostraban cristales desordenados, sin embargo, el uso del péptido en la película de PTL demostró una capa remineralizada densa y ordenada y los cristales regenerados en forma de varilla se distribuyeron uniformemente en la superficie con una orientación relativamente consistente, imitando con éxito la textura similar a las "escamas de pescado" del esmalte natural. Los análisis químicos y cristalográficos (EDS, RAMAN, espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X, XRD y SAED) demostraron que los parámetros de los depósitos formados usando PTL/C-AMG eran consistentes con los de HAP estequiométrica. El ensayo de dureza de Vickers demostró una dureza cercana a la del esmalte natural y el ensayo de emisión acústica al rasgado demostró una fuerza de adhesión que permitiría soportar los retos mecánicos que se presentan durante la masticación <sup>69</sup>. Esta secuencia había sido utilizada previamente con el nombre de péptido “B”<sup>105</sup>.

#### **Péptidos derivados de amelogenina (shADP5 y MPP3)**

Dentro de la estructura de la amelogenina se han identificado dominios peptídicos específicos (de 15-40 residuos) con capacidad para unirse a la HAP. Entre estos dominios peptídicos, denominados péptidos derivados de amelogenina (ADPs Amelogenin-derived peptides), se identificó una secuencia de 22 residuos nombrada ADP5, que facilita la formación de una capa mineral sobre dentina radicular humana. La característica principal de la secuencia de ADP5 son dos pares de residuos con cargas contrarias separados por un giro  $\beta$  que se cree que es esencial para acelerar el proceso de mineralización <sup>106</sup>.

Dogan y colaboradores utilizaron una versión corta de ADP5 (shADP5) y demostraron la formación de una capa continua de cristales en forma de placa lo suficientemente gruesa como para cubrir las varillas de esmalte previamente expuestas. El uso de este péptido en una solución con NaF demostró la presencia de nanopartículas depositadas de 50-100 nm de diámetro y una estructura densa compuesta por nanovarillas de pocas decenas de nanómetros

de diámetro. La observación utilizando TEM (después de haber raspado la superficie) demostró que el depósito formado estaba compuesto por cristales en forma de lámina con un patrón de difracción electrónica que mostraba los planos 302, 130 y 102. El análisis químico realizado mediante EDX demostró una relación Ca/P muy similar a la de HAP estequiométrica. Por último, tanto el ensayo de dureza de Vickers como el de nanoindentación mostraron cierta recuperación de la dureza y módulo elástico pero sin alcanzar los valores característicos del esmalte sano<sup>107</sup>.

Tulumbaci y colaboradores aprovecharon las características de ADP5 y utilizaron un péptido sintético diseñado con cuatro pares de aminoácidos que presentan cargas opuestas y alaninas agregadas (PGEKADRAEKADRA) esta secuencia fue utilizada con una resina sólida y caracterizaron los depósitos formados mediante SEM y el tamaño de las lesiones mediante microscopía de luz polarizada; con ello encontraron que este péptido permite una remineralización superficial rápida que deja regiones subsuperficiales desmineralizadas y encontraron mejores resultados cuando se utilizó el péptido combinado con NaF<sup>54</sup>

### **Péptido de amelogenina rico en leucina (LRAP-mLRAP)**

El péptido de amelogenina rico en leucina (LRAP; leucine rich amelogenin peptide) es un splicing alternativo no fosforilado de la amelogenina que consta de 56 residuos —33 aminoácidos de la porción amino-terminal y 23 aminoácidos de la porción carboxilo-terminal de la amelogenina de tamaño completo— que han demostrado ser las regiones responsables de la formación mineral. LRAP tiene la capacidad de autoensamblarse en nanoesferas y dirigir la formación de cristales de apatitas; además puede interactuar con HAP a través de su porción carboxilo-terminal<sup>108</sup>.

Kwak y cols. mediante SEM-EDS, FT-IR y GIXD, demostraron que LRAP en un medio sobresaturado de Ca/P y pirofosfato inorgánico (PPi; inorganic pyrophosphate), forma una capa mineral con morfología similar al patrón de prismas del esmalte natural: cristales paralelos con forma de aguja densamente empaquetados de ~ 2 µm de espesor, con características cristalográficas y químicas típicas de HAP. Aunque la nueva capa parecía ser algo más porosa que el esmalte subyacente, la interfaz que conectaba las 2 capas parecía ser casi perfecta.<sup>109</sup>

Fang y colaboradores agregaron un motivo que contiene tres tirosinas (PYPSYGYEPMGGW) a la porción amino-terminal de la amelogenina. Con esta modificación sintetizaron un péptido de LRAP al que llamaron mLRAP (modified LRAP) con la secuencia PYPSYGYEPMGGW-LRAP para utilizarlo en una matriz con un péptido análogo de proteínas no-amelogeninas (NAA previamente descrito). En este estudio se realizó el diseño y síntesis de mLRAP y NAA y se utilizaron para tratar muestras de esmalte dental humano desmineralizado. La caracterización de los depósitos se realizó utilizando SEM para la descripción de la morfología de los depósitos formados y XRD y FTIR para la caracterización de los cristales formados. La descripción de estos resultados se discutió en el apartado donde se describió el péptido NAA<sup>104</sup>.

## QPA4+TKREEVD

Luo y cols. identificaron que, durante el autoensamblaje de la amelogenina se mantiene una estructura primaria de naturaleza bipolar —particularmente una región donde se encuentran secuencias repetitivas ricas en prolina (QPX)<sub>n</sub>—que forman una estructura secundaria en forma beta espiral y que a su vez forman monómeros globulares; la amelogenina también contiene una porción carboxilo terminal hidrofílica (TKREEVD), que interactúa con los iones calcio e inicia la nucleación de los cristales de hidroxiapatita. Con esto en mente diseñaron un oligopéptido parecido a la amelogenina con el objeto de controlar la remineralización del esmalte: (QPA)<sub>4</sub>-TKREEVD. En este estudio utilizaron vesículas lipídicas cargadas con iones calcio y fosfato para complementar la estrategia de remineralización y evaluaron las características de los depósitos minerales formados por este péptido mediante SEM, espectroscopía infrarroja, XRD y SAED. Encontraron cristales en forma de varilla que cubrían casi por completo la superficie del esmalte y se distribuían uniformemente haciendo la superficie lisa; el espectro IR, y los patrones de difracción indicaron que se trata de cristales de HAP <sup>110</sup>.

## QP5

Ding y colaboradores identificaron una secuencia altamente conservada en la amelogenina caracterizada por la repetición de residuos Glutamina-Prolina- y otro aminoácido (Q-P-X); A partir de esta secuencia diseñaron un péptido sintético al que llamaron QP5 (5 repeticiones QPX) el cual demostró tener capacidad de remineralización en modelos de caries en ratas. Además, añadieron la secuencia TKREEVD —presente en la porción carboxilo terminal de la amelogenina— que tiene la capacidad de nuclear de cristales de HA. La capacidad de remineralización de este péptido se evaluó mediante SEM-EDS con lo que encontraron la formación de muchos cristales en forma de varilla en la superficie del esmalte y una razón Ca/P cercana a la encontrada en HAP estequiométrica. Para evaluar los cambios en la densidad mineral obtuvieron microradiografías donde reportaron que QP5 tiene un efecto importante disminuyendo la profundidad de lesiones artificiales en muestras de esmalte. Se encontró que el grosor de la zona radiolúcida (desmineralización) disminuye después del uso de QP5<sup>111</sup>.

## Péptido “A”

Xiao y cols. crearon un péptido quimérico en el que combinaron la secuencia LEAWPATDKTKREEVD —formada por 16 aminoácidos derivados de la región rica en leucina en la amelogenina— y la secuencia SVSVGMPSPRP —un péptido sintético que puede unirse específicamente a la superficie de hidroxiapatita del esmalte — unidos mediante un péptido de conexión flexible con secuencia GGGGS. A esta combinación de secuencias aminoacídicas se le llamó péptido “A” (SVSVGMPSPRP-GGGGS- LEAWPATDKTKREEVD). El análisis mediante SEM después del proceso de remineralización en muestras tratadas con este péptido

demonstró la formación gradual de una capa de cristales similares al esmalte y después de 7 días se encontró una capa de cristales ordenados perpendiculares a la superficie de la muestra. La morfología y el patrón de los cristales ordenados eran similares a los de un prisma de esmalte natural con un patrón de difracción característico de HAP. El ensayo de nanoindentación demostró una buena recuperación de la dureza y módulo elástico, pero sin igualar los parámetros encontrados en esmalte sano. En este estudio se utilizó como control un péptido con la secuencia de la porción carboxilo terminal de la amelogenina (LEAWPATDKTKREEVD) al que llamaron péptido “B”<sup>105</sup>, en estudios posteriores se utilizó esta misma secuencia (péptido “B”) con el nombre de C-AMG<sup>69</sup>.

## **P26-P32**

Mukherjee y cols. diseñaron 2 péptidos sintéticos (p26 y p32) inspirados en los dominios funcionales de la amelogenina nativa con 26 y 32 residuos respectivamente. En estos péptidos se mantuvieron los últimos 12 aminoácidos de la porción carboxilo terminal (asociados con la nucleación de cristales y procesos de crecimiento ordenado de HAP) combinados con los residuos E, K y R que promueven estructuras secundarias desordenadas y tienen un efecto positivo en la remineralización del esmalte. Además, el diseño de estos péptidos incluye 14 aminoácidos de la porción amino terminal (1-4 y 16-25) y una serina fosforilada (pS<sup>16</sup>). En el caso de P32 se agregaron 2 regiones de repeticiones de poliprolina (PXX-PXQ) ya que pueden tener un efecto modulador en la elongación y crecimiento de los cristales. Ambos péptidos exhiben una conformación desordenada según ensayos de dicroísmo circular y forman nanoestructuras esféricas cuando se observan utilizando TEM.

La evaluación de los depósitos formados por múltiples aplicaciones de p26 mediante SEM demostró la formación de un recubrimiento denso y continuo, formando múltiples capas de apatitas en forma de columna de ~6 µm cada una. Cuando se utilizó p32 los cristales crecieron paralelos al esmalte prismático subyacente. EL patrón de difracción obtenido mediante XRD demostró el crecimiento de una fase mineral consistente con HAP y un crecimiento preferencial a través del eje c. El ensayo de nanoindentación demostró que el uso de estos péptidos tiene la capacidad de recuperar hasta cierto punto la dureza y módulo elástico de las muestras pero sin igualar las propiedades mecánicas del esmalte sano<sup>112</sup>.



## Hallazgos observados de la caracterización de los depósitos neoformados por efecto de los péptidos.

Además de la gran diversidad de péptidos empleados, hay una gran variabilidad de estrategias metodológicas para evaluar la remineralización del esmalte dental humano. Tal es el caso del uso de ácidos orgánicos para simular lesiones cariosas incipientes en las superficies del esmalte. En estudios realizados por Kucukyilmaz y Batayneh, crearon lesiones artificiales utilizando un gel y una solución de ácido láctico (pH=4.6), respectivamente<sup>61,90</sup>. Üstün y cols. provocaron desmineralización sobre superficies de esmalte con ácido acético (pH=4.3)<sup>79</sup>.

Otra metodología muy concurrida son los sistemas de desmineralización-remineralización continua, en el que se producen cambios periódicos de pH. Esta metodología permite analizar la capacidad de diferentes sustancias activas no solo de promover remineralización si no de prevenir la desmineralización en medios ácidos, simulando la actividad fisiológica del medio bucal. Ding y cols. probaron la eficacia del péptido derivado de tuftelina TDP en muestras de esmalte sometidos a un régimen de remineralización de pH cíclico<sup>103</sup>.

Todos los estudios analizados en esta revisión reportaron la remineralización de las superficies tratadas con los péptidos. En 27 estudios se realizó el análisis mediante MEB para corroborar la morfología y distribución de los depósitos formados en muestras expuestas a un medio supersaturado de iones calcio/fosfato incluso en ausencia de péptidos. Sin embargo, la diferencia más notoria fue el patrón de crecimiento y su distribución<sup>7,68,73,74,93-96,99,100,102,105,107,109-111,113</sup>. Pocos artículos reportan un crecimiento longitudinal y bien ordenado de los cristales sobre la superficie desmineralizada y sólo dos encontraron imágenes bien definidas de la recuperación de la morfología típica de la superficie del esmalte (en forma de “escamas de pescado” o “cerradura”<sup>69,83</sup>).

Algunos autores utilizaron otras técnicas (ya sea complementando MEB) para corroborar si existió remineralización sobre la superficie de esmalte desmineralizada. Los estudios donde no se utilizó MEB, definieron “remineralización” de acuerdo con el fundamento de la técnica empleada.

Qamar y cols. midieron la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en una solución controlada; calcularon las diferencias antes y después de la incubación de las muestras tratadas con péptidos a través de un electrodo selectivo de iones ISE (Ion Selective Electrode). Cuando la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  en la disolución con muestras tratadas es menor, la interpretan como una mejor capacidad para agregarlos a la superficie de la muestra<sup>92</sup>.

Algunas otras técnicas empleadas para determinar la remineralización sobre la superficie del esmalte incluye el uso de técnicas de imagen radiológica como microradiografía transversal usada en los estudios realizados por Ding donde evaluó el uso de TDP y QP5<sup>103,111</sup> y el estudio realizado por Reynolds donde evaluó el uso de CPP<sup>67</sup>. Mediante el análisis de las imágenes radiográficas midieron la profundidad de la lesión —definida como la distancia desde la superficie del esmalte, hasta el punto en donde el contenido mineral alcanza 87% de lo encontrado en esmalte sano—; pérdida mineral —comparando la lesión con tejido sano y expresada en vol%/μm—; y contenido mineral —calculado a partir de los datos obtenidos de profundidad de la lesión y pérdida mineral—. Además, Üstün y cols. y Kind y cols. utilizaron

microtomografía computarizada para analizar, a través de un software, cambios en la profundidad de la lesión (mm), densidad mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ), área de la superficie ( $\text{mm}^2$ ) y volumen ( $\text{mm}^3$ )<sup>79,87</sup>.

13 artículos utilizaron diversas técnicas de fluorescencia para evaluar remineralización sobre la superficie de esmalte desmineralizado. 8 de los artículos donde se utilizó fluorescencia se valieron de métodos comerciales que han probado ser herramientas útiles en la identificación clínica de lesiones cariosas tempranas. Jablonski-Momeni y cols utilizaron el sistema QLF inspektor pro para evaluar los cambios de la superficie del esmalte<sup>63</sup>. Los estudios realizados por Batayneh y cols (referencia) y Kucukyilmaz y cols (referencia) utilizaron el sistema Biluminator que usa el mismo principio de QLF pero presume ser más sensible y preciso<sup>90</sup>.

Autores como Üstün, Bhat, Taranath, Pai y Jablonski-Momeni evaluaron la capacidad remineralizante con el sistema DIAGNOdent<sup>62,71,79,81,89</sup>

Por otro lado, ElSayad y cols. emplearon espectroscopía de autofluorescencia inducida por láser para analizar la remineralización mediante la identificación de bandas a 540nm, 630nm y 670nm en esmalte sano<sup>80</sup>. Silvertown y cols. utilizaron el Canary Number (CN) obtenido por el método de radiometría fototérmica y luminiscencia (PTR-LUM) para determinar pérdida mineral (CN aumenta) y remineralización (CN disminuye) tomando como referencia el estado del esmalte “sano” cuando el CN era  $\leq 20$ <sup>66</sup>. Savas y cols. utilizaron microscopía confocal láser para evaluar remineralización mediante la medición de la profundidad y área de las lesiones antes y después del tratamiento<sup>65</sup>. Tulumbaci y cols. emplearon el microscopio de luz polarizada para analizar la profundidad de la lesión en muestras de esmalte<sup>54</sup>.

A pesar de la “remineralización” observada en las muestras tratadas con los diferentes péptidos, es necesario realizar un análisis más riguroso que nos permita identificar los elementos químicos (presencia/concentración), grupos funcionales y, obtener las características cristalográficas de los depósitos formados sobre la superficie del esmalte.

La mayoría de los estudios que analizaron la morfología de las muestras a través de SEM aprovecharon la herramienta EDS acoplada a este tipo de microscopio electrónico para identificar la cantidad de elementos constitutivos de la HA estequiométrica como Ca y P y algunos elementos que se suelen identificar en la HA que constituye el esmalte humano como F, C y O. Dichos estudios, comparan la relación Ca/P después de la remineralización con el valor obtenido en muestras de esmalte sano. En la mayoría de los análisis por EDS, se encontraron valores muy cercanos a la relación Ca/P característica de HA estequiométrica<sup>7,54,65,67,69,70,72-76,88,98,107,109,111</sup>.

Los estudios realizados por Qamar, Fang, Kwak, Chung y Luo utilizaron espectroscopía infrarroja para el análisis de sus muestras. En las espectroscopías obtenidas a partir de esmalte sano se pueden encontrar bandas características de  $\text{PO}_4^{3-}$  (1090–1032, 960, y 600–500  $\text{cm}^{-1}$ )  $\text{OH}^-$  (633 $\text{cm}^{-1}$ ) y de carbonato (1550, 1460, 1445, 1415 y 870  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>45</sup> En todos los estudios que emplearon esta técnica se identificaron las bandas características para el  $\text{PO}_4^{3-}$ <sup>92,101,102,104,109,110</sup>.

De manera complementaria, la técnica de Raman permite la identificación de vibraciones simétricas en grupos no polares; ya que IR suele ser superior en la identificación de vibraciones

asimétricas en grupos polares <sup>43</sup>. Además de la identificación de las bandas representativas, ambos tipos de espectroscopías permiten determinar el índice de cristalinidad y/o la razón entre la fase cristalina (HAP) y la presencia de fases amorfas mediante el análisis de las bandas presentes en la muestra. Wang y cols reportaron el uso de espectroscopía vibracional Raman y de fotoelectrones emitidos por rayos X, para la identificación de la hidroxiapatita; con el análisis de la banda en 962 cm<sup>-1</sup> se asoció un crecimiento cristalino altamente ordenado en el esmalte remineralizado<sup>69</sup>.

En esta revisión se registraron 10 artículos que reportaron el uso de XRD y 8 reportaron el uso de GIXD. Todos ellos encontraron picos de difracción característicos de la HAP (comparándolo contra difractogramas de HAP estequiométrica). Los autores reportaron tamaño de los cristales en diferentes planos y algunos reportaron también la razón entre la intensidad del plano 002/211 (obteniendo la posible orientación y organización espacial de los cristales) <sup>64,69,78,94-98,100-102,104,105,109,110,112-114</sup>.

Solo 4 estudios reportaron el uso de SAED donde se encontraron patrones de difracción similares a los de la HAP estequiométrica y en el esmalte sano<sup>69,99,101,107</sup>.

Se muestra un resumen de los resultados en la tabla 2.

Tabla 2. Evaluación de los efectos de péptidos sobre la superficie de esmalte desmineralizado		
Péptido	Evaluación del efecto remineralizante	Caracterización cristalina
<b>CPP</b>	SEM (cristales dispersos y desordenados), EDS(Ca/P≈1.75), AFM, Mapeo elemental por microanálisis con sonda de electrones, μCT, Fluorescencia	XRD
<b>P<sub>11-4</sub></b>	SEM (disminución de poros y crecimiento uniforme), EDS (Ca/P≈1.80)μCT, Fluorescencia M. confocal,	No reportado
<b>PGGA</b>	ISE, IR	No reportado
<b>H5</b>	SEM(cristales de 2.5 μm de espesor), ICP-OES	No reportado
<b>SP-H5</b>	SEM(Cristales de 2.5 μm de espesor), ICP-OES	No reportado
<b>MPP3</b>	SEM(Remineralización superficial rápida, regiones subsuperficiales desmineralizadas), EDS	No reportado
<b>shADP5</b>	SEM(Capa continua de cristales en forma de placa), EDS(Ca/P≈1.54), TEM, M. luz polarizada	No reportado
<b>Péptido "A"</b>	SEM (cristales ordenados perpendiculares. La morfología y el patrón eran similares a los de un prisma de esmalte natural)	XRD (Razón 002/211= 1.029±.0094 (esmalte sano =1.159±0.057))
<b>NSS</b>	SEM ( cristales desordenados)	No reportado

<b>5NSS</b>	SEM (cristales desordenados), TEM, IR	No reportado
<b>3NSS</b>	SEM (deposición tanto en varillas como en espacio intevarillas), TEM, AFM	XRD(211,300), SAED
<b>3DSS</b>	SEM (deposición tanto en varillas como en espacio intevarillas), AFM	XRD(211, 300)
<b>DSS8</b>	SEM (hojuelas de tamaño nanométrico), EDS(Ca/P≈1.64), TEM, AFM	XRD
<b>mLRAP</b>	SEM(en combinación con NAA: cristales de 2 μm paralelos en forma de aguja fusionados y empaquetados densamente), IR	XRD
<b>LRAP</b>	SEM(Cristales paralelos en forma de aguja densamente empaquetados de ~ 2 μm ), EDS(Ca/P≈1.57), IR	XRD
<b>NAA</b>	SEM(en combinación con NAA: cristales de 2 μm paralelos en forma de aguja fusionados y empaquetados densamente), IR, XRD	No reportado
<b>TDP</b>	μRx transversal, M. luz polarizada	No reportado
<b>DpSpSEK</b>	SEM (Cristales en forma de varilla cubrieron completamente la superficie.)	XRD Razón 002/211= 1.184 (esmalte sano =1.212)
<b>DDDEK (SAP)</b>	SEM(Nanovarillas ordenadas), AFM	XRD Razón 002/211= 1.17 (esmalte sano =1.21)
<b>Péptido 7</b>	SEM(cristales planos y compactos), EDS	XRD
<b>P26</b>	SEM(crecimiento de apatitas en forma de columna), EDS(Ca/P≈1.77)	XRD Razón 002/211=2.38
<b>P32</b>	SEM(Cristales paralelos al esmalte prismático), EDS(Ca/P≈1.85)	XRD Razón 002/211= 1.34
<b>C-AMG</b>	SEM(+PTL: Cristales en forma de varilla imitando "escamas de pescado" del esmalte natural.), EDS(Ca/P≈1.68), TEM, AFM, RAMAN	XRD 002, SAED
<b>QPA4+TKREEVD</b>	SEM(Cristales en forma de varilla que cubrían casi por completo la superficie), IR	XRD, SAED
<b>QP5</b>	SEM(Cristales en forma de varilla ), EDS(Ca/P≈1.63), μRx transversal	No reportado

Como se ha comentado a lo largo de esta revisión, el esmalte obtiene sus características físicas/mecánicas gracias a su composición y a su organización jerárquica. Las cualidades mecánicas del esmalte dental permiten al sistema masticatorio realizar su función a pesar de los retos físicos a los que está sometido; por ejemplo, debe resistir fuerzas de hasta 770N<sup>1,15</sup>. Es por esto, que los depósitos formados sobre la superficie del esmalte dental no solo deben tener la estructura y composición química adecuada, sino que deben presentar una dureza, módulo elástico y fuerza de adhesión suficientes para permanecer sobre la superficie del tejido y cumplir la función del esmalte natural.

En esta revisión se encontraron 26 estudios que realizaron pruebas de dureza sobre la superficie del esmalte utilizando distintas técnicas.

Los estudios llevados a cabo por Yang y Zhang utilizaron la técnica de Knoop para la evaluación de la dureza de superficie y reportaron el porcentaje de recuperación de la dureza en las muestras remineralizadas contra la medición de las mismas muestras antes del tratamiento con agentes desmineralizantes<sup>94-96</sup>.

Los estudios realizados por Suryani, Dogan, Rai, Kamal, Fang, Liu, Savas, Li, Lata, Stoleriu y Muhammad usaron la técnica de Vickers para la evaluación de la microdureza de superficie<sup>64,65,68,82-86,91,104,107,113</sup>. Es importante mencionar que los parámetros de evaluación fueron muy distintos entre sí; Lata y Stoleriu realizaron las mediciones sobre la superficie transversal al realizar un corte de la muestra a través de la lesión para encontrar la dureza de subsuperficie y llevando a cabo la medición algunas micras debajo de la superficie de la muestra<sup>82,91</sup>. El mejor resultado reportado para la microdureza de superficie utilizando esta técnica, fue el demostrado por el péptido 7 con una dureza de VHN=497.97±19.63<sup>64</sup>.

Wang, Dogan, Xiao, Chung, Zhou, Mukherjee y Hsu utilizaron nanoindentación para obtener la dureza de superficie de las muestras de esmalte remineralizado mediante el uso de péptidos<sup>7,69,78,97-102,105,107</sup>. Los parámetros empleados fueron muy variados entre los estudios y los resultados se reportaron en GPa. El mejor valor de dureza fue encontrado en el estudio de Wang utilizando C-AMG en una nanopelícula de lisozima transitada de fase, GPa=4.5±0.2<sup>69</sup>. El análisis de nanoindentación también ofrece información sobre el módulo elástico aumentando la fuerza de carga gradualmente y hasta la fractura del tejido. El mayor valor para módulo elástico también fue obtenido por Wang utilizando C-AMG en una nanopelícula de lisozima transitada de fase, GPa=86.3±4.2<sup>69</sup>.

Por último, sólo 5 estudios realizados por Yang, Liu, Zhang y Wang<sup>64,69,94-96</sup> realizaron la prueba de última emisión acústica al rasgado para determinar la fuerza con la que los nuevos depósitos se mantienen sobre la muestra; el mejor resultado fue el demostrado por el péptido DpSpSEEKC en el estudio de Yang<sup>96</sup>.

En los estudios de Yang, Chung, Liu, Zhang y Hsu, se empleó AFM y se reportaron cambios en la rugosidad media, algunos de ellos también reportaron rugosidad cuadrada y rugosidad máxima. Todos los estudios que emplearon esta técnica, reportaron una disminución importante en la rugosidad al usar péptidos, esto puede deberse a la manera en que se están organizando los cristales sobre la superficie del esmalte y es importante porque una superficie con mayor rugosidad implica una mayor acumulación de bacterias<sup>64,94-99,102</sup>.

A pesar de utilizar distintas técnicas para el análisis de las propiedades físicas y mecánicas, ninguno de los resultados alcanzó propiedades mecánicas similares a la del esmalte sano. El resumen de los resultados para las pruebas mecánicas se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen de hallazgos de pruebas mecánicas			
Dureza de superficie utilizando la técnica de Vickers			
Autor Principal/Año	Péptido utilizado	Resultados (VHN)	SD(±)
Hafsa Suryani/2020	CPP-ACP	275.7025	6.03946
Sami Dogan/2018	shADP5	141.1	7.8
	shADP5+F	133.5	12.4
Rai, Pooja M/2019	CPP-ACP+F 1semana	331.5	35.9
Dina Kamal/2018	CPP-ACP+F 1semana	277.34	5.01
	CPP-ACP+F 4 semanas	300.28	4.06
	P <sub>11</sub> -4 1 semana	317.6	9.54
	P <sub>11</sub> -4 4 semanas	334.14	8.98
Fang, ZH/2021	mLRAP/NAA	no reportado	no reportado
	mLRAP	no reportado	no reportado
	NAA	no reportado	no reportado
Yahya, YM/2020	CPP-ACP+F	242.81	26.58
	P <sub>11</sub> -4	208.47	8.59
	P <sub>11</sub> -4+F	215.36	11.57
Liu, YB/2018	péptido 7 (4 días)	482.6	21.18
	péptido 7 (8 días)	497.79	19.63
Savas, S/2016	P <sub>11</sub> -4 7d	204.1	11.2
	P <sub>11</sub> -4 30d	235.1	18.2
Li, QL/2014	C-Ame+ácido esteárico 1 día	no reportado	no reportado
	C-Ame+ácido esteárico 20 días	no reportado	no reportado
Dina Kamal/2020	CPP-ACP+F (1 sem)	277.34	5.01
	CPP-ACP+F (4 sem)	300.28	4.06
	P <sub>11</sub> -4 (1 sem)	317.6	9.54
	P <sub>11</sub> -4 (4 sem)	334.14	8.98
	P <sub>11</sub> -4+F (1 sem)	347.72	9.76
	P <sub>11</sub> -4+F (4 sem)	350.52	10.96
	P <sub>11</sub> -4+CPP-ACP+F (1 sem)	349.06	13.72
	P <sub>11</sub> -4+CPP-ACP+F (4 sem)	352.36	13.96
Lata S/2009	CPP-ACP	185.2	30.79
	CPP-ACP+F	216.25	16.96
Evaluación de la dureza transversal			
Lata S/2009	CPP-ACP	150.63	6.78
	CPP-ACP+F	155.51	5.64
Stoleriu, S/2019	P <sub>11</sub> -4 25 µm	98.5	6.98
	P <sub>11</sub> -4 75 µm	143.3	10.29
	P <sub>11</sub> -4 125 µm	258.2	7.56

	P <sub>11</sub> -4 175 µm	278.7	10.07
	P <sub>11</sub> -4 225 µm	293.1	9.59
	P <sub>11</sub> -4 275 µm	321.5	15.68
<b>Dureza de superficie utilizando la técnica de Nanoindentación</b>			
Dong Wang/2020	C-AMG	4.5	0.2
Sami Dogan/2018	shADP5	2.23	0.23
Zuohui Xiao/2017	Péptido "A"	0.7	0.21
Chung/2013	3NSS	1.36	0.22
Chunhua Zhou/2014	CPP-ACP 4 h	1.96	0.33
	CPP-ACP 8 h	2.12	0.12
	CPP-ACP 12 h	2.23	0.12
	CPP-ACP 24 h	2.48	0.19
Chung, HY/2013	3NSS 50 µM	1.082	no reportado
	3NSS 100 µM	1.691	no reportado
	3NSS 200 µM	1.565	no reportado
	5NSS 100 µM	0.721	no reportado
	5NSS 200 µM	0.352	no reportado
Chung, HY/2013	3NSS 33.3 µM	0.86	no reportado
Chung, HY/2012	3DSS 33.3 µM	1.01	no reportado
Hsu, CC /2011	8DSS (SBF)	2.2	no reportado
	8DSS (SBFX2)	2.71	no reportado
Hsu, CC/2011	8DSS		
<b>Módulo elástico utilizando la prueba de Nanoindentación</b>			
Dong Wang/2020	C-AMG	86.3	4.2
Sami Dogan/2018	shADP5	58.6	4.7
Zuohui Xiao/2017	Péptido "A"	66.7	2.4
Hsiu-Ying Chung/2013	3NSS	50.73	3.7
Chunhua Zhou/2014	CPP-ACP 4 h	41.36	2.05
	CPP-ACP 8 h	53.13	5.55
	CPP-ACP 12 h	59.42	4.48
	CPP-ACP 24 h	70.85	4.05
Chung, HY/2013	3NSS 33.3 µM	48.91	no reportado
Chung, HY/2012	3DSS 33.3 µM	43.13	no reportado
Hsu, CC /2011	8DSS (SBF)	64.93	no reportado
	8DSS (SBFX2)	85.53	
Hsu, CC/2011	8DSS		
<b>Fuerza de adhesión utilizando el ensayo de emisión acústica</b>			
Yang/2017	DDDEK (SAP)-TA/FeIII	64.85	no reportado
	DDDEK (SAP)-TA	62.95	
Yinxin Yang/2017	DpSpSEK	72.15	no reportado

Liu, YB/2018	péptido 7	63.8	4.58
Zhang, SH/2016	DDDEEK+OPC	44N	no reportado
	DDDEEK+OPC+FeIII (2 semanas)	46N	no reportado

## Conclusiones.

La alta incidencia de caries en el mundo y el hecho de que el esmalte no tiene la capacidad de regenerarse por si mismo ha enfocado a las investigaciones a encontrar estrategias que permitan la recuperación de cristales de HAP en superficies de esmalte desmineralizadas. En esta revisión se encontró una gran variedad de secuencias peptídicas que han sido probadas para la remineralización de lesiones de tipo mancha blanca en esmalte dental humano, el desarrollo de este tipo de estrategias se describe (en estudios in vitro) desde el año 1997 cuando Reynolds probara un fosfopéptido derivado de la proteína caseína (CPP). A partir de entonces, se han identificado secuencias de proteínas que participan en la formación del esmalte como tuftelina, enamelinina, amelogenina, fosfoproteína dentinaria, e incluso motivos derivados de proteínas como la Histatina y la Estaterina. Una vez que se identificaron y demostraron propiedades importantes para la remineralización del esmalte, estos péptidos sintéticos fueron modificados para mejorar sus características (capacidad de unirse al esmalte, atracción de iones  $Ca^{2+}$  o formación de andamios, entre otras); e incluso, se diseñaron péptidos quiméricos que permiten aprovechar las ventajas de motivos presentes en la misma o en distintas proteínas para potencializar su efecto como el caso de los péptidos P26 y P32. Otro caso destacable es el de la secuencia peptídica de P<sub>11-4</sub> que no se encuentra en ninguna proteína sino que fue diseñada en laboratorio con residuos aminoacídicos que han demostrado tener la capacidad de autoensamblarse y formar un andamio que dirige el crecimiento de cristales y de esta forma promover la remineralización.

Como se demostró en esta revisión, todos los péptidos reportados tienen la capacidad de promover el depósito de minerales; sin embargo, se reportaron una gran variabilidad de morfologías; pues se describieron estructuras en nanovarillas, placas y agujas a partir del análisis de SEM, aunque algunos de ellos reportaron crecimiento ordenado, solo dos mencionan la reproducción del patrón de prismas que semeja a “escamas de pescado” u “ojo de cerradura” característico del esmalte sano. Los depósitos fueron analizados por técnicas como EDX, FTIR y RAMAN, y se determinó que los depósitos estaban formados por iones y grupos funcionales representativos de la fase mineral hidroxiapatita; dicha fase mineral fue corroborada principalmente por técnicas de difracción como XRD y SAED. En los distintos reportes se describe que el depósito formado por efecto de las secuencias peptídicas es en un tiempo menor al observado de manera natural (sin péptido) en un medio sobresaturado; sin embargo, la fuerza de adhesión, dureza y módulo elástico de dichos depósitos no han demostrado igualar los parámetros encontrados en el esmalte sano. Si bien los resultados de las pruebas mecánicas aún no logran cumplir las expectativas, algunos de estos péptidos ya se comercializan para su uso clínico (CPP y P<sub>11-4</sub>). Por lo tanto, estos hallazgos implican un pronóstico reservado y debemos ser cautelosos con su uso clínico en el tratamiento de lesiones de tipo mancha blanca.



## Referencias

1. Beniash E, Stifler CA, Sun CY, Jung GS, Qin Z, Buehler MJ, et al. The hidden structure of human enamel. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–13.
2. Almaguer Flores A, Villagomez Olea JG. *Ecología Oral.* Ciudad de México: Manual Moderno; 2018. 229 p.
3. Kumar GS. Enamel. In: *Orban's oral histology and embryology* [Internet]. 13th ed. New Delhi: Elsevier; 2011. p. 50–92. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001001682721&lang=es&site=eds-live>
4. Nutt S, Mukherjee K, Prajapati S, Moradian-Oldak J, Ruan Q. The Presence of MMP-20 Reinforces Biomimetic Enamel Regrowth. *J Dent Res.* 2017;97(1):84–90.
5. Moradian-Oldak J. Protein-mediated enamel mineralization. *Front Biosci.* 2012;17(6):1996–2023.
6. Simmer JP, Papagerakis P, Smith CE, Fisher DC, Rountrey AN, Zheng L, et al. Regulation of Dental Enamel Shape and Hardness. *J Dent Res* [Internet]. 2010 Oct 30 [cited 2019 May 2];89(10):1024–38. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034510375829>
7. Mukherjee K, Ruan Q, Nutt S, Tao J, De Yoreo JJ, Moradian-Oldak J. Peptide-Based Bioinspired Approach to Regrowing Multilayered Aprismatic Enamel. *ACS Omega.* 2018;3(3):2546–57.
8. Castellanos JE, Marín Gallón LM, Úsuga Vacca MV, Castiblanco Rubio GA, Martignon Biermann S. La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental. *Univ Odontol* [Internet]. 2013;32(69):49–59. Available from: <http://hdl.handle.net/10554/30801>
9. Pandya M, Diekwisch TGH. Enamel biomimetics—fiction or future of dentistry. Vol. 11, *International Journal of Oral Science.* 2019.
10. Gutiérrez-Salazar M del P, Reyes-Gasga J. Microhardness and chemical composition of human tooth. *Mater Res* [Internet]. 2003 Jun [cited 2019 May 2];6(3):367–73. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-14392003000300011&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-14392003000300011&lng=en&tlng=en)
11. Chiego D. Esmalte. In: *Principios de histología y embriología bucal : con orientación clínica.* 4th ed. Barcelona: Elsevier; 2014. p. 92–100.
12. Cao Y, Mei ML, Li QL, Lo ECM, Chu CH. Enamel prism-like tissue regeneration using enamel matrix derivative. *J Dent* [Internet]. 2014;42(12):1535–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2014.08.014>
13. Jayasudha, Baswaraj, Navin H, Prasanna K. Enamel Regeneration - Current Progress and Challenges. *J Clin Diagnostic Res.* 2014;8(9):6–9.
14. Mohd Said SNB, Ekambaram M, Yiu CKY. Effect of different fluoride varnishes on

- remineralization of artificial enamel carious lesions. *Int J Paediatr Dent*. 2017;27(3):163–73.
15. Li X, Wang J, Joiner A, Chang J. The remineralisation of enamel: A review of the literature. *J Dent [Internet]*. 2014;42:S12–20. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50003-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50003-6)
  16. Masters J, Composto RJ, Sullivan R, Pepe-Mooney B, Miksa D, Bassani AW, et al. Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion. *J Colloid Interface Sci [Internet]*. 2012;385(1):235–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2012.06.074>
  17. Simmer JP, Fincham AG. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(2):84–108.
  18. Dorozhkin S V. Dental Applications of Calcium Orthophosphates (CaPO<sub>4</sub>). *J Dent Res*. 2019;1(1):024–54.
  19. Hannig M, Hannig C. Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat Nanotechnol*. 2010;5(8):565–9.
  20. He LH, Swain M V. Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2008;1(1):18–29.
  21. Fejerskov O, Kidd E. *Dental Caries: The disease and its clinical Management*. Second. Oxford, UK: Blackwell Munksgaard; 2008. 641 p.
  22. MacHiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res*. 2020;54(1):7–14.
  23. World Health Organization. Sugars and dental caries [Internet]. WHO Technical Information Note. 2017. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259413/WHO-NMH-NHD-17.12-eng.pdf;jsessionid=89535E10A2E30E25542651DC1EB434E0?sequence=1>
  24. Ruan Q, Siddiqah N, Li X, Nutt S, Moradian-Oldak J. Amelogenin-chitosan matrix for human enamel regrowth: Effects of viscosity and supersaturation degree. *Connect Tissue Res*. 2014;55(SUPPL. 1):150–4.
  25. The Story of Fluoridation [Internet]. National Institute Of Dental and Craniofacial Research. 2018. Available from: <https://www.nidcr.nih.gov/health-info/fluoride/the-story-of-fluoridation>
  26. Yeom B, Sain T, Lacevic N, Bukharina D, Cha SH, Waas AM, et al. Abiotic tooth enamel. *Nature [Internet]*. 2017;543(7643):95–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature21410>
  27. Ruan Q, Bapat R, Chandrababu KB, Phark JH, Liberman D, Moradian-Oldak J. Efficacy of amelogenin-chitosan hydrogel in biomimetic repair of human enamel in pH-cycling systems. *J Biomed Eng Informatics*. 2015;2(1):119.

28. Ruan Q, Zhang Y, Yang X, Nutt S, Moradian-Oldak J. An amelogenin-chitosan matrix promotes assembly of an enamel-like layer with a dense interface. *Acta Biomater* [Internet]. 2013;9(7):7289–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.004>
29. Ruan Q, Moradian-Oldak J. Development of Amelogenin-chitosan Hydrogel for *In Vitro* Enamel Regrowth with a Dense Interface. *J Vis Exp*. 2014;(89):13–4.
30. Li L, Mao C, Wang J, Xu X, Pan H, Deng Y, et al. Bio-inspired enamel repair via glu-directed assembly of apatite nanoparticles: An approach to biomaterials with optimal characteristics. *Adv Mater* [Internet]. 2011 Oct 25 [cited 2020 Jul 9];23(40):4695–701. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21915920/>
31. Mukherjee K, Ruan Q, Liberman D, White SN, Moradian-Oldak J. Repairing human tooth enamel with leucine-rich amelogenin peptide-chitosan hydrogel. *J Mater Res*. 2016;31(5):556–63.
32. Khare T, Oak U, Shriram V, Verma SK, Kumar V. Chapter Ten - Biologically synthesized nanomaterials and their antimicrobial potentials. In: Verma SK, Das AK, editors. *Engineered Nanomaterials and Phytonanotechnology: Challenges for Plant Sustainability* [Internet]. Elsevier; 2019. p. 263–89. (Comprehensive Analytical Chemistry; vol. 87). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166526X19300893>
33. Rani M, Keshu, Shanker U. Chapter 3 - Green nanomaterials: An overview. In: Shanker U, Hussain CM, Rani M, editors. *Green Functionalized Nanomaterials for Environmental Applications* [Internet]. Elsevier; 2022. p. 43–80. (Micro and Nano Technologies). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128231371000269>
34. Parupudi A, Mulagapati SHR, Subramony JA. Chapter 1 - Nanoparticle technologies: Recent state of the art and emerging opportunities. In: Kesharwani P, Singh KK, editors. *Nanoparticle Therapeutics* [Internet]. Academic Press; 2022. p. 3–46. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128207574000090>
35. Kumar PS, Pavithra KG, Naushad M. Chapter 4 - Characterization techniques for nanomaterials. In: Thomas S, Sakho EHM, Kalarikkal N, Oluwafemi SO, Wu J, editors. *Nanomaterials for Solar Cell Applications* [Internet]. Elsevier; 2019. p. 97–124. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128133378000047>
36. Farré M, Barceló D. Chapter 1 - Introduction to the Analysis and Risk of Nanomaterials in Environmental and Food Samples. In: Farré M, Barceló D, editors. *Analysis and Risk of Nanomaterials in Environmental and Food Samples* [Internet]. Elsevier; 2012. p. 1–32. (Comprehensive Analytical Chemistry; vol. 59). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444563286000013>
37. Sinha Ray S. 4 - Techniques for characterizing the structure and properties of polymer nanocomposites. In: Sinha Ray S, editor. *Environmentally Friendly Polymer Nanocomposites* [Internet]. Woodhead Publishing; 2013. p. 74–88. (Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857097774500048>

38. Sabu Thomas, Yves Grohens, Guillaume Vignaud, Nandakumar Kalarikkal JJ. Chapter 7 - Nanotechnology-based fiber-optic chemical and biosensors. In: Nano-Optics. 2020. p. 163–95.
39. Štulík K. ION-SELECTIVE ELECTRODES | Overview. In: Worsfold P, Townshend A, Poole C, editors. Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition) [Internet]. Second Edi. Oxford: Elsevier; 2005. p. 493–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977002910>
40. Instituto de Catálisis y Petroleoquímica CS de IC. Espectroscopía De Emisión Atómica Icp-Oes [Internet]. 02. 2019. Available from: [https://icp.csic.es/archivos/uapoyo/2020/Descripcion ICP\\_02.pdf](https://icp.csic.es/archivos/uapoyo/2020/Descripcion ICP_02.pdf)
41. de la Guardia M, Armenta S. Chapter 6 - Multianalyte Determination Versus One-at-a-Time Methodologies. In: Guardia MD La, Armenta S, editors. Green Analytical Chemistry [Internet]. Elsevier; 2011. p. 121–56. (Comprehensive Analytical Chemistry; vol. 57). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444537096000069>
42. Llovet X. Microscopy | Electron Probe Microanalysis. Encycl Anal Sci. 2019 Jan 1;30–8.
43. Larkin P. Introduction. In: Infrared and Raman Spectroscopy [Internet]. Elsevier; 2011. p. 1–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123869845100011>
44. TERMINE JD, POSNER AS. Infra-Red Determination of the Percentage of Crystallinity in Apatitic Calcium Phosphates. Nature [Internet]. 1966 Jul;211(5046):268–70. Available from: <https://www.nature.com/articles/211268a0>
45. Reyes-Gasga J, Martínez-Piñeiro EL, Rodríguez-Álvarez G, Tiznado-Orozco GE, García-García R, Brès EF. XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. Mater Sci Eng C [Internet]. 2013 Dec;33(8):4568–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.014>
46. Engelhard MH, Droubay TC, Du Y. X-Ray Photoelectron Spectroscopy Applications. Encycl Spectrosc Spectrom. 2017 Jan 1;716–24.
47. Becker K, Engler K, Trakiniené G, Attin T, Attin R. Advanced transversal microradiography enables single section demineralization experiments. Meas J Int Meas Confed. 2020;149.
48. Dowker SEP, Elliott JC, Davis GR, Wilson RM, Cloetens P. Three-dimensional study of human dental fissure enamel by synchrotron X-ray microtomography. Eur J Oral Sci. 2006;114(SUPPL. 1):353–9.
49. Nadeem H, Heindel TJ. Review of noninvasive methods to characterize granular mixing. Powder Technol [Internet]. 2018;332:331–50. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591018302286>
50. Garcia JA, Mandelis A, Abrams SH, Matvienko A. Photothermal Radiometry and Modulated Luminescence: Applications for Dental Caries Detection. Handb Biophotonics. 2013;(January).
51. Iranzo-Cortés JE, Montiel-Company JM, Almerich-Torres T, Bellot-Arcís C, Almerich-

- Silla JM. Use of DIAGNOdent and vistaproof in diagnostic of pre-cavitated caries lesions—A systematic review and meta-analysis. *J Clin Med*. 2020;9(1).
52. Canette A, Briandet R. MICROSCOPY | Confocal Laser Scanning Microscopy. In: Batt CA, Tortorello M Lou, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* [Internet]. Second Edi. Oxford: Academic Press; 2014. p. 676–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300002147>
  53. Frandsen AF. Polarized light microscopy.
  54. Tulumbaci F, Gungormus M. In vitro remineralization of primary teeth with a mineralization-promoting peptide containing dental varnish. *J Appl Oral Sci*. 2020;28:1–9.
  55. Kohli R, Mittal KL, editors. Chapter 3 - Methods for Assessing Surface Cleanliness. In: *Developments in Surface Contamination and Cleaning, Volume 12* [Internet]. Elsevier; 2019. p. 23–105. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128160817000036>
  56. Behroozibakhsh M, Hajizamani H, Shekofteh K, Otadi M, Ghavami-Lahiji M, Faal Nazari NS. Comparative assessment of the crystalline structures of powder and bulk human dental enamel by X-ray diffraction analysis. *J Oral Biosci* [Internet]. 2019;61(3):173–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.job.2019.06.003>
  57. Simeone D, Baldinozzi G, Gosset D, Le Caer S, Bézar JF. Grazing incidence X-ray diffraction for the study of polycrystalline layers. *Thin Solid Films*. 2013;530:9–13.
  58. Janik H, Wrona M. Asbestos ☆. In: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [Internet]. Elsevier; 2017. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095472143112>
  59. Arnold S, Plate U, Wiesmann HP, Stratmann U, Kohl H, Höhling HJ. Quantitative analyses of the biomineralization of different hard tissues. *J Microsc*. 2001;202(3):488–94.
  60. Tomastik J, Ctvrtlik R, Bohac P, Drab M, Koula V, Cvrk K, et al. Utilization of acoustic emission in scratch test evaluation. *Key Eng Mater*. 2015;662(September):119–22.
  61. Al-Batayneh OB, Jbarat RA, Al-Khateeb SN. Effect of application sequence of fluoride and CPP-ACP on remineralization of white spot lesions in primary teeth: An in-vitro study. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2017;83(August):236–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.08.003>
  62. Taranath A, Pai D, Chakravarthy K. The role of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate products in remineralization of incipient enamel lesions and its substantivity. *J Exp Integr Med*. 2014;4(1):67.
  63. Jablonski-Momeni A, Nothelfer R, Morawietz M, Kiesow A, Korbmacher-Steiner H. Impact of self-assembling peptides in remineralisation of artificial early enamel lesions adjacent to orthodontic brackets. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–11.
  64. Liu Y, Ding C, He L, Yang X, Gou Y, Xu X, et al. Bioinspired heptapeptides as functionalized mineralization inducers with enhanced hydroxyapatite affinity. *J Mater Chem B*. 2018;6(13):1984–94.

65. Savas S, Kucukyilmaz E, Celik EU. Effects of remineralization agents on artificial carious lesions. *Pediatr Dent*. 2016;38(7):511–8.
66. Silvertown JD, Wong BPY, Sivagurunathan KS, Abrams SH, Kirkham J, Amaechi BT. Remineralization of natural early caries lesions in vitro by P11 -4 monitored with photothermal radiometry and luminescence. *J Investig Clin Dent*. 2017;8(4):1–9.
67. Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res*. 1997;76(9):1587–95.
68. Suryani H, Gehlot P, Manjunath M. Evaluation of the remineralisation potential of bioactive glass, nanohydroxyapatite and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate fluoride-based toothpastes on enamel erosion lesion -An Ex Vivo study. *Indian J Dent Res*. 2020;31(5):670–7.
69. Wang D, Deng J, Deng X, Fang C, Zhang X, Yang P. Controlling Enamel Remineralization by Amyloid-Like Amelogenin Mimics. *Adv Mater*. 2020;32(31):1–13.
70. Sindhura V. Evaluation of enamel remineralizing potential of self-assembling peptide P11-4 on artificially induced enamel lesions in vitro. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2018;36.
71. Pai D, Bhat SS, Taranath A, Sargod S, Pai MV. Use of laser fluorescence and scanning electron microscope to evaluate remineralization of incipient enamel lesions remineralized by topical application of casein phospho peptide amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) containing cream. *J Clin Pediatr Dent*. 2008;32(3):201–6.
72. Khanduri N, Kurup D, Mitra M. Quantitative evaluation of remineralizing potential of three agents on artificially demineralized human enamel using scanning electron microscopy imaging and energy-dispersive analytical X-ray element analysis: An in vitro study. Vol. 17, *Dental Research Journal*. 2020. p. 366–72.
73. Hegde M, Moany A. Remineralization of enamel subsurface lesions with casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: A quantitative energy dispersive X-ray analysis using scanning electron microscopy: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2012;15(1):61.
74. Keskin G, Guler C, Yildirim S. Is It Possible to Regain Lost Minerals to Initial Enamel Lesions Using Enamel Matrix Derivatives Combined with Casein Phosphopeptide Amorphous Calcium Phosphate: An In Vitro Study. *Eur J Ther*. 2020;26(3):172–7.
75. Rajendran R, Nair K, Sandhya R, Krishnan A, Anilkumar A, Rakhi P. Development of strontium-doped nano hydroxyapatite dentifrice and compare its remineralising potential with a topical cream containing casein phosphopeptide- amorphous calcium phosphate - An in Vitro study. *Indian J Dent Res*. 2021;32(1):92–7.
76. Tripathi P, Mengi R, Gajare SM, Nanda SS, Wani SA, Kochhar AS. Evaluation of Remineralizing Capacity of P11-4, CPP-ACP, Silver Diamine Fluoride, and NovaMin: An In Vitro Study. *J Contemp Dent Pract*. 2021;22(4):357–60.
77. Talaat DM, Mahmoud A. Acid resistance of enamel subsurface lesions treated with casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate fluoride. *J Dent Child*.

2015;82(2):70–5.

78. Zhou C, Zhang D, Bai Y, Li S. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate remineralization of primary teeth early enamel lesions. *J Dent*. 2014;42(1):21–9.
79. Üstün N, Aktören O. Analysis of efficacy of the self-assembling peptide-based remineralization agent on artificial enamel lesions. *Microsc Res Tech*. 2019;82(7):1065–72.
80. ElSayad I, Sakr A, Badr Y. Combining casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate with fluoride: synergistic remineralization potential of artificially demineralized enamel or not? *J Biomed Opt*. 2009;14(4):044039.
81. Bhat SS, Hegde KS, Habibullah MA, Bernhardt V. Incipient enamel lesions remineralization using casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate cream with and without fluoride: A laser fluorescence study. *J Clin Pediatr Dent*. 2012;36(4):253–355.
82. Lata S, Varghese N, Varughese J. Remineralization potential of fluoride and amorphous calcium phosphate-casein phospho peptide on enamel lesions: An in vitro comparative evaluation . *J Conserv Dent*. 2010;13(1):42.
83. Kamal D, Hassanein H, Elkassas D, Hamza H. Complementary remineralizing effect of self-assembling peptide (P11-4) with CPP-ACPF or fluoride: An in vitro study. *J Clin Exp Dent*. 2020;12(2):e161–8.
84. Rai PM. Comparative In Vitro Evaluation of The Novel Remineralizing Agents' Effects on Enamel Surface Hardness. *J Int Dent Med Res*. 2019;12(2):454–9.
85. Kamal D, Hassanein H, Elkassas D, Hamza H. Comparative evaluation of remineralizing efficacy of biomimetic self-assembling peptide on artificially induced enamel lesions: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2018;21(5):536–41.
86. Muhammad Y, Al Rawi N. Remineralizing Efficacy of Biomimetic Self-Assembling Peptide on Artificially Induced Enamel Lesions (In vitro Study). *J Res Med Dent Sci*. 2020;8(7).
87. Kind L, Stevanovic S, Wuttig S, Wimberger S, Hofer J, Müller B, et al. Biomimetic Remineralization of Carious Lesions by Self-Assembling Peptide. *J Dent Res*. 2017;96(7):790–7.
88. Kirkham J. Self-Assembling Peptide Scaffolds Promote Enamel Remineralization. 2009;3(2008):2009.
89. Jablonski-Momeni A, Heinzl-Gutenbrunner M. Efficacy of the self-assembling peptide P11-4 in construct- ing a remineralization scaffold on artificially-induced enamel lesions on smooth surfaces. *J Orofac Orthop*. 2014;75(3):175–90.
90. Kucukyilmaz E, Savas S. Measuring the Remineralization Potential of Different Agents with Quantitative Light-Induced Fluorescence Digital Biluminator. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2017;15(1):101–6.
91. Stoleriu S, Iovan G, Pancu G, Nica I, Georgescu A, Tofan N, et al. Study regarding the capacity of self-assembling peptides to remineralize the acute and chronic incipient

- caries lesions. *Rev Chim.* 2019;70(8):3073–6.
92. Qamar Z, Haji Abdul Rahim ZB, Neon GS, Chew HP, Zeeshan T. Effectiveness of poly- $\gamma$ -glutamic acid in maintaining enamel integrity. Vol. 106, *Archives of Oral Biology*. 2019.
  93. Zhou L, Wong HM, Zhang YY, Li QL. Constructing an Antibiofouling and Mineralizing Bioactive Tooth Surface to Protect against Decay and Promote Self-Healing. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(2):3021–31.
  94. Yang X, Yang B, He L, Li R, Liao Y, Zhang S, et al. Bioinspired Peptide-Decorated Tannic Acid for in Situ Remineralization of Tooth Enamel: In Vitro and in Vivo Evaluation. *ACS Biomater Sci Eng*. 2017;3(12):3553–62.
  95. Zhang S, He L, Yang Y, Yang B, Liao Y, Xu X, et al. Effective In situ repair and bacteriostatic material of tooth enamel based on salivary acquired pellicle inspired oligomeric procyanidins. *Polym Chem*. 2016;7(44):6761–9.
  96. Yang Y, Yang B, Li M, Wang Y, Yang X, Li J. Salivary acquired pellicle-inspired DpSpSEKCC peptide for the restoration of demineralized tooth enamel. *Biomed Mater*. 2017;12(2).
  97. Chung HY, Li CC, Hsu CC. Characterization of the effects of 3DSS peptide on remineralized enamel in artificial saliva. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2012;6:74–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.10.008>
  98. Hsu CC, Chung HY, Yang JM, Shi W, Wu B. Influences of ionic concentration on nanomechanical behaviors for remineralized enamel. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011;4(8):1982–9.
  99. Hsu CC, Chung HY, Yang JM, Shi W, Wu B. Influence of 8DSS peptide on nano-mechanical behavior of human enamel. *J Dent Res*. 2011;90(1):88–92.
  100. Chung HY, Huang KC. Effects of peptide concentration on remineralization of eroded enamel. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2013;28:213–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.08.004>
  101. Chung HY, Li CC. Asparagine-serine-serine peptide regulates enamel remineralization in vitro. *J Mater Res*. 2013;28(20):2890–6.
  102. Chung HY, Li CC. Microstructure and nanomechanical properties of enamel remineralized with asparagine-serine-serine peptide. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2013;33(2):969–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.031>
  103. Ding L, Han S, Peng X, Wang K, Zheng S, Li H, et al. Tuftelin-derived peptide facilitates remineralization of initial enamel caries in vitro. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2020;108(8):3261–9.
  104. Fang Z, Guo M, Zhou Q, Li Q, Wong HM, Cao CY. Enamel-like tissue regeneration by using biomimetic enamel matrix proteins. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2021;183:2131–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.028>
  105. Xiao Z, Que K, Wang H, An R, Chen Z, Qiu Z, et al. Rapid biomimetic remineralization of the demineralized enamel surface using nano-particles of amorphous calcium



- phosphate guided by chimaeric peptides. *Dent Mater.* 2017;33(11):1217–28.
106. Gungormus M, Ozdogan MS, Ertem SY, Tulumbaci F, Kara H, Orhan M. Accelerated Calcium Phosphate Mineralization by Peptides with Adjacent Oppositely Charged Residues. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020;6(7):3791–8.
  107. Dogan S, Fong H, Yucesoy DT, Cousin T, Gresswell C, Dag S, et al. Biomimetic Tooth Repair: Amelogenin-Derived Peptide Enables in Vitro Remineralization of Human Enamel. *ACS Biomater Sci Eng.* 2018;4(5):1788–96.
  108. Le Norcy E, Kwak SY, Wiedemann-Bidlack FB, Beniash E, Yamakoshi Y, Simmer JP, et al. Leucine-rich amelogenin peptides regulate mineralization in vitro. *J Dent Res.* 2011;90(9):1091–7.
  109. Kwak SY, Litman A, Margolis HC, Yamakoshi Y, Simmer JP. Biomimetic Enamel Regeneration Mediated by Leucine-Rich Amelogenin Peptide. *J Dent Res.* 2017;96(5):524–30.
  110. Luo J, Ning T, Cao Y, Zhu X, Xu X, Tang X, et al. Biomimetic enamel remineralization by hybridization calcium- and phosphate-loaded liposomes with amelogenin-inspired peptide. *Key Eng Mater.* 2012;512–515:1727–30.
  111. Ding L, Han S, Wang K, Zheng S, Zheng W, Peng X, et al. Remineralization of enamel caries by an amelogenin-derived peptide and fluoride in vitro. *Regen Biomater.* 2020;7(3):283–92.
  112. Mukherjee K, Ruan Q, Nutt S, Tao J, De Yoreo JJ, Moradian-Oldak J. Peptide-Based Bioinspired Approach to Regrowing Multilayered Aprismatic Enamel. *ACS Omega.* 2018;3(3):2546–57.
  113. Li QL, Ning TY, Cao Y, Zhang W bo, Mei ML, Chu CH. A novel self-assembled oligopeptide amphiphile for biomimetic mineralization of enamel. *BMC Biotechnol.* 2014;14.
  114. Hsu CC, Chung HY, Hagerman EM, Shi W, Yang JM, Wu B. Effects on hardness and elastic modulus for DSS-8 peptide treatment on remineralization of human dental tissues. *Mater Res Soc Symp Proc.* 2008;1151(October):114–21.