



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**EFFECTO DE UN GEL DE QUITOSANO COMBINADO  
CON PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROTEÍNA CEMP1  
Y CAP SOBRE ESMALTE DENTAL HUMANO  
DESMINERALIZADO POR EROSIÓN ENDÓGENA.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N A   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

MARÍA FERNANDA GÓMEZ LARA

TUTOR: Dr. GONZALO MONTOYA AYALA

ASESORES: Dr. HIGINIO ARZATE  
Dr. SAMUEL TEHUACANERO CUAPA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

*Gracias...*

A mi amada Universidad Nacional Autónoma de México, por volverse mi hogar al abrirme sus puertas y ayudarme a crecer profesionalmente. Porque cada lugar que he recorrido en sus instalaciones tiene recuerdos y aprendizajes que han dejado huella a lo largo de mi vida.

*“La educación es un ornamento en la prosperidad y un refugio en la adversidad”. -Aristóteles*

Al Dr. Gonzalo Montoya, porque sin su paciencia y constancia este trabajo no se hubiese logrado. Por sus consejos y tiempo al formar parte importante de esta historia con sus aportes profesionales y palabras de aliento cuando las horas de trabajo se hacían eternas.

Al Dr. Higinio Arzate, por permitirme asistir al laboratorio y por sus sabias palabras, sus conocimientos rigurosos y precisos.

Al Dr. Samuel Tehuacanero, por su ayuda y guía al transmitir sus conocimientos, por su tiempo y paciencia invertidos en este proyecto.

*“La enseñanza es más que impartir conocimiento, es inspirar el cambio. El aprendizaje es más que absorber hechos, es adquirir entendimiento”. -William Arthur Ward*

El presente proyecto de investigación fue realizado gracias a los recursos otorgados por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM: **IT200123, IN206723.**

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

*Gracias...*

A mis padres Gabriela y Arturo, porque han sido siempre el motor que impulsa mis sueños y esperanzas, por inspirarme a crecer en mi vida. Les dedico a ustedes este logro como una meta más conquistada.

A mi hermano Alejandro, por apoyarme, aconsejarme y volverse el mejor compañero en este viaje llamado vida.

A mi abue Miguel, que extraño tanto y aunque no está, a la distancia siempre ha sido mi ángel, mi motor y mi guía en todo momento.

A mi abue Salustia, porque sus consejos y palabras de aliento hicieron de mi una mejor persona y por acompañarme en mis sueños y metas.

*"Tener un lugar para ir es un hogar. Tener a alguien a quien amar es una familia. Tener ambas es una bendición". -Donna Hedges*

A mí, por ser tan persistente, objetiva y dedicada para lograr lo que me propongo. Aunque este solo es el comienzo de un largo camino, lo estoy logrando.

El presente trabajo está dedicado a mi familia que ha sido mi apoyo incondicional a lo largo de toda mi formación profesional y a lo largo de mi vida.

*«El mayor arsenal que cualquier hombre puede traer a la vida, consiste en los recursos de su propia mente, su inteligencia, sus estrategias y su fuerza de voluntad. Y tú, mi joven amigo, tienes mucho de ellos.»*

***Alexander Joseph Luthor***

# ÍNDICE

I.	<b><u>Resumen</u></b> .....	3
	<u>Abstract</u> .....	4
II.	<b><u>Introducción</u></b> .....	5
III.	<b>Marco teórico</b>	
	1. <u>Esmalte dental</u> .....	7
	2. <u>Saliva</u> .....	9
	3. <u>Erosión dental</u> .....	12
	4. <u>Remineralización</u> .....	14
	5. <u>Métodos de caracterización fisicoquímica de biominerales</u> .....	19
IV.	<b><u>Planteamiento del problema y justificación</u></b> .....	22
V.	<b><u>Hipótesis</u></b> .....	23
	<u>Hipótesis nula</u> .....	23
VI.	<b><u>Objetivo general</u></b> .....	23
	<u>Objetivos específicos</u> .....	23
VII.	<b>Metodología</b>	
	<u>Péptidos bioactivos</u> .....	24
	<u>Preparación del gel de quitosano</u> .....	24
	<u>Preparación de las muestras de dientes</u> .....	24
	<u>Selección de grupos</u> .....	25
	<u>Tratamiento de las superficies de esmalte con péptidos bioactivos y pH cíclico</u> .....	26
	<u>Caracterización de los depósitos minerales</u> .....	27
	<u>Análisis de resultados</u> .....	27

VIII.	<b><u>Resultados</u></b> .....	28
IX.	<b><u>Discusión</u></b> .....	36
X.	<b><u>Conclusiones</u></b> .....	40
XI.	<b>Anexo</b>	
	A. <b><u>Código de aminoácidos</u></b> .....	41
XII.	<b><u>Referencias</u></b> .....	42

## I. RESUMEN

Los trastornos alimenticios son enfermedades en las cuales las personas experimentan alteraciones graves en sus hábitos alimentarios. Se caracterizan por presentar diversos síntomas y lesiones, incluyendo la erosión dental.

La erosión dental endógena se debe a una exposición crónica de la estructura dental a un ambiente ácido como el ocasionado por el jugo gástrico, cuyo principal componente es el ácido clorhídrico (pH 1-1.5). Actualmente, las investigaciones se han enfocado en encontrar alternativas terapéuticas que permitan mantener o recuperar la estructura dental expuesta a estas condiciones ácidas como es el empleo de péptidos derivados de proteínas.

En el presente trabajo se emplearon dos péptidos derivados de proteínas del cemento, CEMP1-p3 y CAP-p15. Con el objetivo de estudiar el efecto de estos péptidos sobre esmalte dental humano sometido a desmineralización por medio de un modelo que simula lesiones por erosión endógena.

Se emplearon muestras de esmalte dental humano previamente seleccionadas y con indicaciones profilácticas, donde se colocó esmalte dental para delimitar una zona de 4mm<sup>2</sup> que fue el área de trabajo. Posteriormente para simular las lesiones de erosión endógena, se colocaron en una solución de HCl (0.06 mol/L), donde se sumergieron por 3 horas y se enjuagaron con H<sub>2</sub>O desionizada.

Para simular las condiciones en la cavidad oral, se empleó el pH cíclico durante 7 días, acompañado de la colocación de los péptidos mediante un vehículo, el cual fue el hidrogel de quitosano al 0.2%. Al término de los días de cultivo, las muestras se analizaron con MEB, EDS y RAMAN.

Las imágenes obtenidas mediante MEB y los análisis mediante EDS y RAMAN, demuestran que los péptidos CEMP1-p3 y CAPp-15 colaboran de manera benéfica en la formación y depósitos de iones fosfato y calcio en el esmalte.



## ABSTRACT

Eating disorders are diseases in which people experience severe alterations in their eating habits. They are characterized by various symptoms and lesions, including dental erosion.

Endogenous dental erosion is due to chronic exposure of the dental structure to an acidic environment such as that caused by gastric juice, whose main component is hydrochloric acid (pH 1-1.5). Currently, research has focused on finding therapeutic alternatives that allow the maintenance or recovery of tooth structure exposed to these acidic conditions, such as the use of protein-derived peptides.

In the present work, two peptides derived from cementum proteins, CEMP1-p3 and CAP-p15, were used. The objective was to study the effect of these peptides on human dental enamel subjected to demineralization by means of a model that simulates endogenous erosion lesions.

Previously selected samples of human dental enamel with prophylactic indications were used, where dental enamel was placed to delimit an area of 4mm<sup>2</sup> which was the working area. Subsequently, to simulate endogenous erosion lesions, they were placed in a solution of HCl (0.06 mol/L), where they were submerged for 3 hours and rinsed with deionized H<sub>2</sub>O.

To simulate the conditions in the oral cavity, cyclic pH was used for 7 days, accompanied by the placement of the peptides by means of a vehicle, which was 0.2% chitosan hydrogel. At the end of the culture days, the samples were analyzed by SEM, EDS and RAMAN.

The images obtained by SEM and the analyses by EDS and RAMAN show that the CEMP1-p3 and CAPp-15 peptides collaborate beneficially in the formation and deposition of phosphate and calcium ions in the enamel.

## II. INTRODUCCIÓN

Con el inicio del siglo XXI, la influencia de los medios de comunicación y el acelerado ritmo de vida que lleva la población mundial han provocado un aumento considerable en la incidencia de trastornos alimenticios. De acuerdo con la American Psychiatric Association (APA), los trastornos alimenticios son enfermedades en las que las personas experimentan alteraciones graves en sus hábitos alimentarios relacionados con las emociones y pensamientos. Son trastornos de origen multifactorial que se caracterizan por presentar diversos síntomas y lesiones, incluyendo la erosión dental.<sup>1,2</sup>

Los trastornos de la conducta alimentaria (TCA) y sus efectos en el cuerpo humano repercuten en la cavidad oral. Se han documentado desde años atrás algunas consecuencias de los TCA. Mendoza y Nistal (1998), al igual que Gay y Ramírez (2000), explicaron las lesiones provocadas en los pacientes pertenecientes al subgrupo purgativo de la bulimia nerviosa, de las cuales destacan la erosión dental y alteraciones en las glándulas salivales.<sup>3,4</sup>

La erosión dental o perimólisis, está definida según la Asociación Dental Americana (ADA), como la pérdida irreversible de la estructura del diente debido a la desmineralización química del esmalte por ácidos ajenos a los que se obtienen como producto del metabolismo de las bacterias. Es un problema creciente en la población general, y puede ser atribuida a factores exógenos y endógenos.<sup>5</sup>

La erosión dental endógena se debe a una exposición crónica de la estructura dental a un ambiente ácido como el ocasionado por el jugo gástrico, cuyo principal componente es el ácido clorhídrico (pH 1-1.5). Esta exposición a dichas condiciones acídicas puede asociarse a condiciones como el reflujo gastroesofágico, úlceras duodenales, anorexia nerviosa o síndrome de bulimia, o como resultado de náuseas prolongadas e intensas durante el embarazo.<sup>6</sup>

Diversos estudios en el área odontológica, sugieren el uso de antiácidos, fluoruros y prácticas de higiene bucal para aminorar el daño de este tipo de erosión sobre la estructura del esmalte. Aunque el fluoruro se sigue empleando en la prevención y tratamiento de la caries dental, su eficacia sigue siendo controversial.<sup>6</sup>

Los enfoques en la regeneración del esmalte se han visto limitados por la alta complejidad para imitar el proceso de amelogénesis y, por lo tanto, el crecimiento de prismas similares a los del esmalte dental. Se han desarrollado métodos para crear tejido similar al esmalte, acercándonos cada vez más a la regeneración de este tejido altamente especializado.<sup>7</sup>

Actualmente, las investigaciones se han enfocado en encontrar alternativas terapéuticas que permitan mantener o recuperar la estructura dental expuesta a estas condiciones ácidas. Estas alternativas incluyen enfoques físicos, bioingeniería, cultivos de células de esmalte, ingeniería de tejidos y regeneración dental total. Todas estas técnicas han supuesto importantes avances para la síntesis de tejido similar al esmalte, pero presentan importantes limitaciones en su aplicación.<sup>8</sup>

Gracias al desarrollo tecnológico se han empleado diferentes estrategias (microscopía electrónica, espectroscopía molecular, entre otros) para demostrar que algunos compuestos químicos promueven la formación de cristales de hidroxiapatita, así como favorecer su crecimiento y regular la morfología de esta fase mineral.

En el presente estudio se emplearon péptidos derivados de proteínas del cemento radicular que han demostrado tener un efecto importante en el proceso de mineralización. Un péptido derivado de la proteína de cemento 1 (CEMP1-p3), y un péptido derivado de la proteína de adhesión al cemento (CAPp-15) con la finalidad de estudiar su efecto sobre el esmalte dental humano sometido a desmineralización por medio de un modelo que simula lesiones por erosión endógena.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 1. ESMALTE DENTAL

El esmalte dental es un tejido mineralizado que recubre la corona del diente. Es sintetizado por células especializadas de origen ectodérmico, llamadas ameloblastos, durante un proceso denominado amelogénesis.<sup>9</sup> Los ameloblastos se encargan de secretar una matriz orgánica que dirige el crecimiento y regula la maduración del componente mineral del esmalte representado por la hidroxiapatita (HA) cuya fórmula estequiométrica es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .<sup>10,11</sup> Las células y moléculas orgánicas se pierden una vez que este tejido madura y es expuesto al medio bucal (erupción dental) perdiendo toda capacidad de regeneración.

El análisis a nivel micrométrico revela subunidades básicas de la estructura, las cuales son denominadas prismas del esmalte, y se muestran en la **Figura 1**.

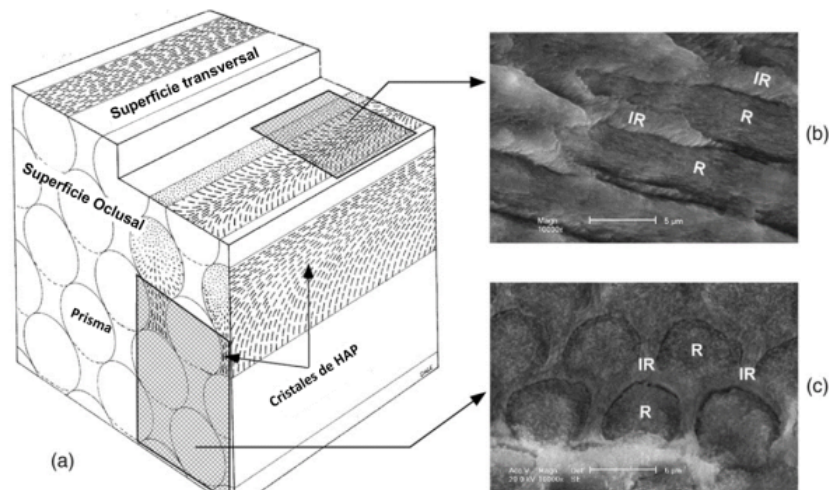


Figura 1. a) Ilustración esquemática de la estructura jerárquica del esmalte dental propuesta por Eisenmann (1998). b) y c) imágenes obtenidas mediante SEM de distintas perspectivas de los prismas.<sup>12</sup>

Los prismas del esmalte son conjuntos de cristales hexagonales largos y delgados de hidroxiapatita, que se localizan desde la dentina hacia la superficie externa del esmalte, de forma regular u ondulada. Los cristales del esmalte se encuentran inicialmente dentro de una matriz orgánica única.<sup>13</sup>

El esmalte está constituido por matriz orgánica (0.36 a 1%), matriz inorgánica (97%) y agua (2%).<sup>14</sup> Debido a su composición química y alta organización prismática, el esmalte es uno de los componentes más duros del cuerpo.<sup>15</sup>

El esmalte posee diferentes propiedades físicas como:

El esmalte muestra un alto grado de mineralización, por lo que representa al tejido más duro (en la escala de Mohs presenta una dureza con valor de cinco); además se considera la estructura más radiopaca del organismo humano, por lo que podemos valorar el grado de desmineralización mediante radiografías.<sup>16-18</sup>

Su elasticidad es escasa, ya que depende de la cantidad de agua y sustancia orgánica presente en su estructura; el mayor grado de elasticidad la presenta el cuello del diente debido a que posee mayor contenido orgánico.<sup>18</sup>

Su color es translúcido y está sujeto a la estructura subyacente, la dentina. Las zonas que presentan mayor espesor tienen una tonalidad grisácea y en las zonas con menor espesor presenta un color blanco amarillento. La transparencia está relacionada con las variaciones en el grado de calcificación y homogeneidad. A mayor grado de calcificación, su translucidez también incrementa.<sup>17,18</sup>

El esmalte actúa como una membrana semipermeable, permitiendo de manera selectiva la difusión de agua y algunos iones presentes en la saliva. La permeabilidad adquiere importancia durante los procesos dinámicos de desmineralización y remineralización de este tejido frente a las variaciones del pH salival en el medio bucal.<sup>14</sup>

Aunado a lo anterior, el esmalte es la única estructura dental que está en contacto con el medio bucal y puede verse afectado debido a los hábitos alimenticios.

Gracias a la presencia de la saliva y sus componentes orgánicos, el esmalte se mantiene húmedo y cubierto para ayudar a su preservación en virtud de la presencia de iones de calcio y fósforo, protegiendo así de la disolución por ácidos. Sin embargo, es un tejido susceptible al ataque de sustancias ácidos; pues presenta un pH crítico (de disolución) de 5.5.<sup>16</sup>

## 2. SALIVA

La saliva es una secreción exocrina secretada por las glándulas salivales menores y mayores (parótidas, submandibulares y sublinguales), que al mezclarse con los componentes de origen no glandular, deja de ser un fluido estéril.<sup>5</sup>

El 99 % del volumen de la saliva es agua, mientras que el 1% está constituido por componentes inorgánicos, también conocidos como electrolitos; entre los que destacan el sodio ( $\text{Na}^+$ ), cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ).<sup>19,20</sup>

Dentro de los componentes orgánicos que integran a la saliva, se encuentran:

>Amilasa: Es una enzima encontrada en mayor porcentaje y es producida por las glándulas parótidas, tiene por función la degradación del almidón para contribuir al proceso digestivo.<sup>19-22</sup>

>Mucinas: Glicoproteínas de alto peso molecular, que participan en la lubricación y protección de los tejidos orales y mantienen la viscoelasticidad salival. Regulan la adhesión de manera selectiva de microorganismos a las superficies orales.<sup>22</sup>

>Inmunoglobulinas: Principalmente la inmunoglobulina A (IgA), actúa como mecanismo de defensa de la saliva, ya que tiene la capacidad de impedir la adherencia y aglutinación de microorganismos a los tejidos orales.<sup>19,22,23</sup>

>Histatinas: Son un grupo de proteínas ricas en histidina y desempeñan un papel importante en la acción antifúngica. Las histatinas más abundantes en la saliva son la 1, 3 y 5. La histatina 5 inhibe al hongo *C. albicans*.<sup>24</sup>

>Lisozima: Forma parte del mecanismo de defensa innato y posee la capacidad de destruir la pared celular de las bacterias Gram positivas.<sup>19,22,25</sup>

>Proteínas salivales ricas en prolina (PRP): Ayudan al equilibrio de la microbiota oral al actuar de manera selectiva sobre la adhesión bacteriana.<sup>19,22</sup>

>Estaterinas: Esta fosfoproteína es capaz de unirse a la hidroxiapatita y reduce la capacidad de las bacterias para adherirse contribuyendo así a la formación de la biopelícula dental.

>Lactoferrina: Tiene la capacidad de unirse al hierro, limitando la capacidad de ser utilizado por algunos microorganismos durante su crecimiento. También contribuye a la degradación de las membranas celulares microbianas.<sup>19,22,23</sup>

>Agglutininas: Son glucoproteínas que participan en la inmunidad innata y tienen como función la unión a bacterias facilitando su eliminación.<sup>24</sup>

>Defensinas: Se catalogan como péptidos de bajo peso molecular, poseen una gran cantidad de aminoácidos básicos capaces de elevar el pH e impedir la desmineralización. Tienen capacidad antimicrobiana debido a que establecen interacciones electrostáticas con la pared celular (carga negativa), formando poros que permiten la fuga de componentes intracelulares y conducen a la muerte de los microorganismos.<sup>24,25</sup>

La saliva cumple con diversas funciones para crear un equilibrio ecológico apropiado y para mantener la salud bucal:

- › **Lubricación y protección**: la saliva es un líquido seromucoso que gracias a la presencia de mucinas permite la lubricación y mantenimiento de la viscoelasticidad salival. Mediadores inmunológicos como inmunoglobulina A (IgA), enzimáticos, péptidos, entre otras moléculas regulan la microflora oral.<sup>26</sup>

› **Digestión:** La amilasa salival participa en la degradación de los alimentos convirtiéndolos en estructuras más simples para poder digerirlos con más facilidad. La acción de esta enzima se frena al llegar al estómago por el pH ácido que el jugo gástrico mantiene.<sup>21</sup>

› **Mantenimiento de la integridad dental:** Esta función está estrechamente relacionada con la sobresaturación de iones como el calcio y fosfato que promueven la remineralización del esmalte.

La estaterina es una proteína salival encargada de contribuir a la estabilización de solución de calcio y fosfato, sirve como lubricante y puede iniciar la formación de una película protectora uniéndose a la hidroxiapatita.<sup>22</sup>

› **Limpieza y acción amortiguadora (Buffer):** La saliva lleva cabo la limpieza o autoclisis con ayuda de los movimientos involuntarios de la lengua y labios, eliminando así el exceso de alimento o sobrepoblación microbiana.<sup>21,22</sup>

Mantiene el pH en un equilibrio constante para amortiguar los ácidos de la ingesta dietética y los ácidos que son producidos por la fermentación de carbohidratos realizada por las bacterias, disminuyendo así la desmineralización del diente. El bicarbonato es el buffer más importante ya que es capaz de neutralizar el ácido formado por metabolismo microbiano.<sup>27</sup>

En la cavidad oral el pH salival oscila dentro de un rango de 6.7 a 7.5, presentando variaciones debido al tipo de clima, hora del día, posición del cuerpo, tamaño de glándulas, hora de la última comida y estímulos presentes en ese momento.<sup>28</sup> A pesar de estos factores, en el medio bucal se busca un equilibrio en el intercambio iónico que se da entre el esmalte y su microambiente.

Cuando el pH aumenta de valor, sucede una sobresaturación de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{PO}_4^{-3}$  en el medio. De este modo, se incorporan iones al esmalte y a este fenómeno se le conoce como remineralización. En cambio, cuando el pH de la saliva se ve afectado y disminuye drásticamente sucede una subsaturación de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{PO}_4^{-3}$  produciéndose como consecuencia la desmineralización del esmalte.<sup>16</sup>



Este proceso dinámico de desmineralización-rem mineralización es crucial para mantener la integridad de los tejidos dentales (**Fig. 2**). La pérdida de esta homeostasis puede dar lugar al proceso de caries o erosión dental.

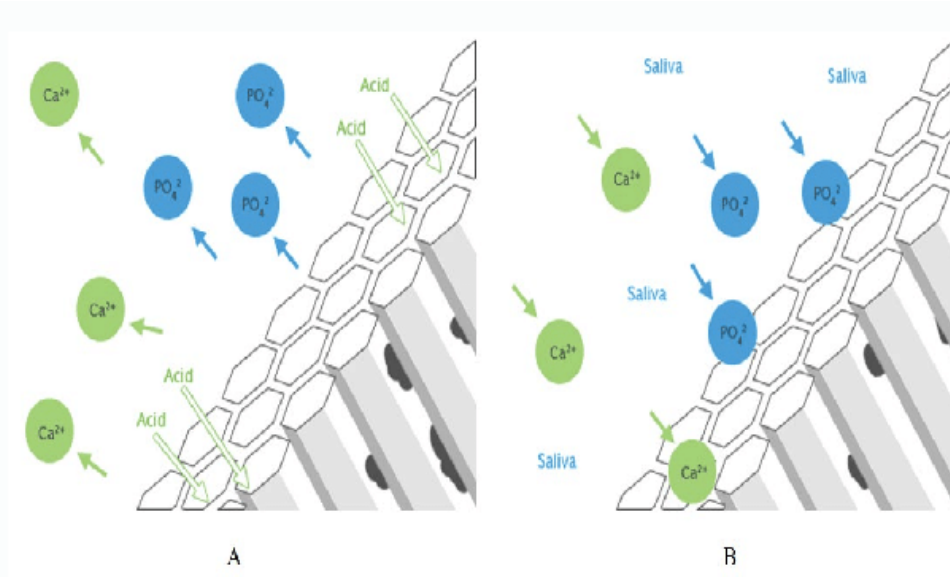


Figura 2. Dibujo esquemático del proceso de la A) desmineralización y B) remineralización del esmalte dental.<sup>29</sup>

### 3. EROSIÓN DENTAL

De acuerdo con la declaración de la Federación Dental Internacional (FDI), la erosión dental se define como “la pérdida progresiva de estructura dental, en el cual el tejido dental es removido a través de un proceso químico de origen no bacteriano”.<sup>30</sup>

Bonecker, Ríos y Auad (2017), describen a este proceso como “el resultado de la exposición crónica a ácidos de origen no bacteriano, lo cual es un aspecto diferencial importante en relación con la caries dental”.<sup>31</sup>

En este proceso, los ácidos que participan pueden ser de origen exógeno o endógeno.

## **Ácidos de origen exógeno**

Aquí se agrupan todos aquellos ácidos presentes en alimentos, bebidas deportivas/energéticas, frutas, vegetales, aderezos, vinagre, alcohol, bebidas carbonatadas, té, jugos de frutas; los cuales presentan un pH muy bajo. Es importante destacar que respecto a los alimentos y bebidas no solo influye el valor de pH ácido que presenten, sino también la frecuencia, la forma de ingestión y el tiempo que transcurre de la ingesta del alimento ácido a la realización de la limpieza dental.<sup>32,33</sup>

## **Ácidos de origen endógeno**

El principal ácido endógeno, causante de la erosión del esmalte, es el ácido clorhídrico; el cual, es el principal componente del jugo gástrico y que al ingresar a la cavidad bucal afecta de manera importante la integridad del esmalte dental al rebasar su pH crítico (5.5).<sup>34</sup>

Las condiciones, en muchas ocasiones patológicas, que dan lugar a la exposición de ácidos endógenos son:

- › **REFLUJO GASTROESOFÁGICO:** Consiste en el paso del contenido gástrico hacia la porción distal del esófago; en ocasiones es asintomático considerándolo como fenómeno fisiológico que ocurre después y durante el consumo de un alimento.<sup>31</sup>
  
- › **BULIMIA:** Es un trastorno de la conducta alimentaria que consiste en episodios de atracones (ingesta excesiva de alimentos) en periodos cortos seguidos de comportamientos compensatorios que pueden ser de origen purgativo y no purgativo.<sup>35</sup>

Los comportamientos de tipo purgativo son aquellos que se caracterizan de vómitos autoinducidos y el uso incorrecto de laxantes y diuréticos con la finalidad de compensar la cantidad de alimento consumido. En cambio, en

los comportamientos no purgativos se restringe el consumo de alimentos, realizan dietas extremas o abuso de ejercicio.

La erosión dental o perimolisis es un signo característico para el diagnóstico en un paciente que padece de bulimia de tipo purgativa y presenta un importante problema de salud debido a la exposición crónica de los ácidos gástricos.<sup>15,36</sup>

La erosión se considera una patología recurrente en la cavidad oral y se ve influida por el estilo de vida de cada individuo. En el área dental, estas lesiones se observan como superficies dentales uniformes y “pulidas” en las caras palatinas de los dientes (más comúnmente observadas en dientes superiores).<sup>36</sup>

El grado de pérdida de estructura dental producido por la perimolisis es distinto en cada individuo, pues dependen de factores como el recambio y pH salival, del grado de mineralización de la superficie dental, de la presencia de parafunciones, del consumo de un tipo de dieta ácida y del nivel de higiene oral.<sup>37</sup>

Ante este tipo de lesión podemos encontrar diferentes enfoques que tienen como finalidad recuperar los cristales perdidos ante la agresión de los ácidos.

#### 4. REMINERALIZACIÓN

El enfoque tradicional para tratar de recuperar los cristales perdidos en ambientes ácidos es la remineralización de la superficie del esmalte o ingeniería *in situ*; esto aprovecha la capacidad de la superficie del esmalte para alterar su estructura química o mecánica mediante el uso de sustratos de proteínas en un ambiente que trata de emular las características fisiológicas del medio bucal.<sup>38</sup> Un agente remineralizante se puede definir como una sustancia capaz de promover la remineralización del tejido dental.<sup>39</sup>

En la actualidad el estándar de oro para la “recuperación” de cristales sobre la superficie de esmalte desmineralizada es el uso de compuestos a base de Flúor, como el fluoruro de sodio (NaF) o el fluoro-monofosfato de sodio (Na<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>F) en

distintas presentaciones (barniz, pasta, políticas públicas de fluoración de sal y/o agua).<sup>38</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.<sup>40</sup>

Recientemente, varios agentes bioactivos han surgido como alternativas para la prevención y tratamiento de la erosión dental. Tal es el caso de péptidos derivados de proteínas del esmalte, o derivados de otras proteínas e incluso se han diseñado péptidos totalmente sintéticos quiméricos que de acuerdo a su secuencia aminoacídica y propiedades fisicoquímicas han demostrado poseer la capacidad de promover el depósito de mineral sobre esmalte desmineralizado.

En este contexto, en el *Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados* se han estudiado dos proteínas aisladas de la matriz extracelular del cemento radicular. La expresión *in vitro* de la proteína del cemento 1 (CEMP1) se limita a cementoblastos putativos, células derivadas del ligamento periodontal con una localización perivascular y células de los espacios endósteales. Se encuentra codificada en un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 16 segmento 13.3 (16p13.3), presenta un peso molecular de 25.9 kDa, y un punto isoelectrico alcalino (pI 9.73).<sup>41-44</sup>

CEMP1 es una proteína glicosilada, fosforilada y termoestable, compuesta por 247 aminoácidos y su secuencia se encuentra enriquecida principalmente por prolinas, glicinas, alaninas y leucinas (**Tabla 1**).<sup>41-43</sup>

Esta proteína posee una alta afinidad a la HA, propiedad que pudiera atribuirse a la presencia de secuencias de aminoácidos poliácidos que tendrían la capacidad de atraer cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$ ; además posee la capacidad de promover la formación, regula la tasa de deposición, la composición y la morfología de cristales de apatitas en estudios *in vitro*; e incluso, promueve la regeneración de hueso *in vivo*.<sup>41,45</sup>

10	20	30	40	50
MGTSSTDSQQ	AGHRRRCSTSN	TSAENLTCLS	LPGSPGKTAP	LPGPAQAGAG
60	70	80	90	100
<b>QPLPKGCAAV</b>	<b>KAEVGIPAPH</b>	TSQEVRIHIR	RLLSWAAPGA	CGLRSTPCAL
110	120	130	140	150
PQALPQARPC	PGRWFFPGCS	LPTGGAQTIL	SLWTWRHFLN	WALQGREENS
160	170	180	190	200
GRARRVPPVP	RTAPVSKGEG	SHPPQNSNGE	KVKTITPDVG	LHQSLTSDPT
210	220	230	240	
VAVLRAKRAP	EAHPPRSCSG	SLTARVCHMG	VCQGQGDTE	GRMTLMG

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de la proteína del cemento 1 (**CEMP1**).

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

Otra molécula ampliamente estudiada es la proteína de adhesión al cemento (HACD1/CAP) la cual fue la primera proteína aislada específicamente del cemento humano.<sup>44</sup> El gen de esta proteína se ubica en cromosoma 10, específicamente en la región 13-14 del brazo corto. Este gen, durante los procesos de transcripción generó dos isoformas diferentes, la primera es la proteína 3-hidroxiacil-CoA-deshidratasa 1 (HACD1), la cual contiene 288 aminoácidos y está relacionada con el metabolismo de ácidos grasos. La segunda isoforma, derivada de un splicing alternativo, es la proteína CAP conformada por 140 aminoácidos (**Tabla 2**). Esta proteína se diferencia de HACD1 debido a la presencia de los últimos 15 aminoácidos, ubicados en el extremo carboxilo terminal.<sup>46,47</sup> Como resultado de esto, la proteína presenta un cambio importante en su función pues se ha demostrado que esta proteína promueve la migración y proliferación de células del ligamento periodontal, así como de células óseas. Además, se autoensamblan en nanoesferas e inducen la formación de tejido mineralizado en un modelo de defecto de tamaño crítico.

En sistemas libres de células, se ha demostrado que la proteína regula la formación y crecimiento de cristales de HA.<sup>48-51</sup>

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

Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de la proteína de adhesión al cemento (HACD1/CAP).

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

A partir de estas proteínas, se han identificado secuencias peptídicas con la capacidad de mimetizar algunas funciones de la proteína completa, pues han demostrado poseer alta afinidad a cristales de hidroxiapatita regulando su formación y crecimiento en sistemas libres de células, e incluso, inducen la diferenciación de células del ligamento periodontal hacia un fenotipo mineralizante y promueven la formación de tejido óseo *de novo* en defectos de tamaño crítico en calvarias de rata y tibias de conejo.<sup>49,52</sup>

Estudios recientes mostraron que una secuencia identificada como CEMP1-p3, conformada entre los aminoácidos 61-70 promueve la formación y crecimiento de fosfato octacálcico, en un sistema libre de células.<sup>53</sup>

Estudios realizados por Santana, et al., (2020) demostraron, mediante un análisis *in silico*, que CEMP1-p3 posee un carácter hidrofílico y es una secuencia cargada de manera positiva en condiciones fisiológicas, la cual podría interactuar con los grupos  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{OH}^-$  de minerales biológicos. Además, se destaca que esta secuencia peptídica promueve la transformación de fosfato octacálcico a un

estado más estable como lo es la HA, bajo condiciones de sobresaturación iónica y en una solución fisiológica simulada, por lo que proponen su empleo para futuros estudios de regeneración de tejidos mineralizados .<sup>52</sup>

Por otro lado, la secuencia de 15 residuos aminoácidos (CAP-p15) que hacen la diferencia entre HACD1 y CAP ha demostrado tener la capacidad de promover la formación de cristales de HA, esto bajo un sistema experimental de contra-difusión en gel libre de células; además de poseer una alta afinidad para unirse a esta apatita de importancia biológica.<sup>49</sup> En investigaciones anteriores, se empleó este péptido en la funcionalización de superficies de titanio (Ti) y óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), y se demostró que posee una adsorción preferencial a las películas de TiO<sub>2</sub> promoviendo la precipitación de hidroxiapatita carbonatada en una solución fisiológica.<sup>54</sup>

En los últimos años, se empleó este péptido en un modelo *in vivo* (ratas wistar), donde los resultados demostraron que es capaz de promover la regeneración de cemento y hueso alveolar ya que induce la formación de una matriz cementoide y osteoide; a su vez, no hubo modificación en el espacio del ligamento periodontal. Además, fue visible la inserción de las fibras de Sharpey en la matriz cementoide.<sup>44</sup>

Si bien las ventajas que brinda el empleo de péptidos bioactivos (mayor estabilidad química, más económicos, menos inmunogénicos, mayor especificidad funcional) al compararse con las proteínas, les ha permitido posicionarse como una alternativa prometedora en la ingeniería de tejidos; diversos estudios se han enfocado en mejorar la aplicación de estas secuencias aminoacídicas empleando una gran diversidad de andamios o vehículo/excipientes que permiten volver más eficiente su función, tal es el caso del quitosano.

El quitosano es un polisacárido de cadena lineal con carga positiva<sup>55</sup>, exhibe bajo costo, biodegradabilidad, biocompatibilidad y, propiedades antiinflamatorias.<sup>56</sup> Este polisacárido puede sintetizarse en forma de hidrogeles proporcionando un

sustrato para inmovilizar las unidades de nanoconstrucción de HAP y a su vez actúa como plantilla para su ensamblaje estructural.<sup>56-58</sup>

Gracias a este polímero es probable que se desarrollen capas de quitosano en las superficies de esmalte que pueden funcionar como barreras estables al pH contra los ácidos<sup>59</sup>; Además, se cree que estas capas poseen efectos lubricantes en el tejido dental.<sup>55</sup>

Aunado al empleo de biomoléculas en diferentes excipientes, una de las estrategias metodológicas más empleadas para probar la eficacia de agentes remineralizantes es el modelo de pH cíclico.

El propósito de este método es la reproducción de las condiciones de desmineralización y remineralización que se presentan en la cavidad bucal de manera fisiológica (modelo Ten Cate);<sup>1,60</sup> particularmente, es emular las condiciones de saturación iónica y pH de la saliva (6.7 a 7.5).<sup>25-27,37</sup>

El uso del pH cíclico en sinergia con la aplicación de péptidos ha logrado ayudar en la remineralización.

Para proveer de información cualitativa y cuantitativa respecto a la neoformación de depósitos minerales se han implementado diferentes técnicas de caracterización, las cuales pueden ser de caracterización morfológica, identificación química, espectroscopia vibracional, análisis de propiedades físicas, caracterización cristalina y caracterización mecánica.<sup>39</sup>

## 5. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE BIOMINERALES

### Técnicas de caracterización morfológica

El esmalte presenta una estructura y organización muy característica, por lo que los múltiples estudios enfocados en la remineralización de este tejido han empleado una gran diversidad de técnicas para demostrar su “éxito”.



Si bien el desarrollo tecnológico pone a la mano técnicas muy sofisticadas, precisas, y en ocasiones complejas; hay técnicas indispensables y que son elementales; tal es el caso de la microscopía que nos permite observar forma, tamaño, topografía, entre otras.

El microscopio electrónico de barrido (MEB) utiliza un haz de electrones de alta energía (5-30 kV), en lugar de un haz de luz como lo hace un óptico, para formar una imagen ampliada de las distintas estructuras biológicas de la superficie del objeto que se observa. Facilita la obtención de imágenes nítidas y con una alta resolución de hasta 100Å.<sup>61</sup>

En el MEB es necesario acelerar los electrones en un campo eléctrico, aprovechando su comportamiento ondulatorio dentro de la columna del microscopio. Para obtener resultados precisos, se requiere tener conocimiento con anterioridad sobre la muestra a analizar para poder prepararla de manera correcta y obtener así imágenes fiables las cuales permitan un análisis representativo y confiable.

Además de las características morfológicas, es importante contar con herramientas que nos permitan determinar la composición química de las muestras a estudiar. Particularmente, el esmalte posee un alto contenido de calcio y fósforo, acompañado por cantidades menores de otros iones denominados elementos traza.

Para caracterizar los cambios químicos que presenta la superficie del esmalte se emplean técnicas que permitan conocer la pérdida o integración de elementos químicos.

Una técnica analítica muy socorrida es la Espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDS), la cual, utiliza un detector acoplado a un microscopio electrónico y tiene como finalidad proporcionar información cualitativa como cuantitativa de un material sólido (minerales).

Sumado a la identificación de los elementos químicos presentes en una muestra, las técnicas de espectroscopía vibracional permiten obtener información de los grupos funcionales mediante el estudio de la vibración de las moléculas (nivel de energía dada por los enlaces formados entre los elementos) en la muestra.

Los niveles de energía son únicos, lo cual representa una “huella digital” para cada molécula<sup>39</sup> y son caracterizadas por su frecuencia, intensidad y forma. La espectroscopia Raman es una técnica no destructiva, cuyo análisis es directamente sobre el material sin necesidad de ningún tipo de preparación especial y, además, proporciona en poco tiempo información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. Se fundamenta en un evento de dispersión de luz inelástica; donde, el fotón incidente tiene una energía mucho mayor que el estado cuántico vibratorio y pierde parte de su energía debido a la vibración de la molécula de la sonda y se dispersa como un fotón de frecuencia reducida.<sup>39</sup>

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

Actualmente existe mucho énfasis con la apariencia humana, imponiendo un patrón estándar que muchos jóvenes quieren lograr para adaptarse a la sociedad; sin embargo, este patrón puede desencadenar trastornos alimentarios que afectan la salud.

Estos desórdenes alimentarios pueden provocar una variedad de alteraciones sistémicas y efectos dentales severos, entre los cuales encontramos lesiones de erosión sobre la estructura del esmalte dental causada por el ácido del vómito inducido.

Debido al daño irreversible del esmalte en condiciones erosivas endógenas, es muy importante llevar a cabo una atención integral del paciente.

Desde el punto de vista odontológico, numerosas investigaciones se han enfocado en desarrollar estrategias encaminadas a la remineralización del esmalte dental, ya sea mediante el uso de biomoléculas o compuestos a base de compuestos inorgánicos que permitan restituir el tejido perdido. Sin embargo, aún con los resultados prometedores con el desarrollo de los sistemas biomiméticos que combinan el uso de aditivos orgánicos o nano apatitas, su aplicación clínica aún requiere de más estudios.

El presente estudio tiene como meta, estudiar el efecto de secuencias peptídicas derivadas de proteínas del cemento radicular (CEMP1 y CAP) sobre superficie de esmalte desmineralizado a partir de un modelo que simula lesiones por erosión endógena.

## V. HIPÓTESIS

- **Hipótesis de trabajo**

Las secuencias peptídicas derivadas de CAP y CEMP1 promueven la formación de apatitas sobre esmalte dental humano sometido a desmineralización por medio de un modelo que simula lesiones por erosión endógena.

- **Hipótesis nula**

Las secuencias peptídicas derivadas de CAP y CEMP1 no promueven la formación de apatitas sobre esmalte dental humano sometido a desmineralización por medio de un modelo que simula lesiones por erosión endógena.

## VI. OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Estudiar el efecto de los péptidos derivados de CAP (CAP-p15) y CEMP1 (CEMP1-p3) sobre esmalte dental humano sometido a desmineralización por medio de un modelo que simula lesiones por erosión endógena.

### **Objetivos específicos**

- › Analizar las características fisicoquímicas de los péptidos bioactivos derivados de CAP-p15 y CEMP1-p3.
- › Determinar la capacidad de promover la mineralización sobre el esmalte dental del péptido derivado de la proteína CEMP1-p3.
- › Determinar la capacidad de promover la mineralización sobre el esmalte dental del péptido derivado de la proteína CAP-p15.
- › Describir la ultraestructura y composición química de los depósitos formados en el esmalte por el efecto de los diferentes péptidos bioactivos mediante diferentes técnicas de microscopía electrónica y espectroscopia molecular.

## VII. METODOLOGÍA

### **Péptidos bioactivos**

La síntesis de los péptidos bioactivos seleccionados se llevó a cabo a partir de la técnica de Sheppard por fase sólida (Fmoc), el grado de pureza (>90%) se determinó a partir de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); dicha síntesis se solicitó a la casa comercial New England Peptide (NEP, Ipswich, MA, EUA).

Las propiedades fisicoquímicas de los péptidos bioactivos, seleccionados a partir de la secuencia completa de las proteínas CEMP1-p3 y CAP-p15, se obtuvieron a partir del análisis *in silico*.

### **Preparación del gel de quitosano**

El hidrogel de quitosano al 0.2% se preparó mezclando quitosano (con peso molecular medio, y de un 75-85% de desacetilación) en ácido acético al 1%; esta solución se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 hrs hasta su completa disolución. Una vez obtenido el hidrogel, se aliquotaron en 3 tubos, en dos de ellos se añadieron 200 µg, de manera independiente, de cada uno de los péptidos seleccionados.

### **Preparación de las muestras de dientes**

Se emplearon muestras de esmalte dental humano obtenidos a partir de molares extraídos por indicaciones profilácticas, cumpliendo con todos los lineamientos y bajo la aprobación del *Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología-UNAM* (CIE/0305/11/2020, con actualización vigente al 2022).

Las muestras se lavaron con agua y se mantuvieron en agua desionizada a 4°C hasta que se inició la etapa experimental.

Se analizaron con microscopio estereoscópico para excluir aquellas muestras con defectos en el esmalte, fracturas, tinciones o caries.

Se seccionó la corona del órgano dentario 1mm por debajo de la unión cemento-esmalte y posteriormente se obtuvieron muestras de esmalte de aproximadamente 7mm<sup>2</sup>, con ayuda de un disco de diamante y abundante irrigación.

Se recubrieron con dos capas de pintura de esmalte resistente al ácido, delimitando una ventana de trabajo de 4mm<sup>2</sup>.

Para simular las lesiones por erosión endógena se empleó una solución de HCl (0.06 mol/L), donde se sumergieron por 3 horas y se enjuagaron con agua desionizada (H<sub>2</sub>O dd).

Para eliminar las capas de pintura, las muestras se lavaron con acetona y ultrasonido por 5 minutos y se enjuagaron 3 veces con H<sub>2</sub>O dd y ultrasonido.

### **Selección de grupos**

Las muestras se dividieron, de manera aleatoria, en grupos con n=10 cada uno.

Donde se contempló un grupo control sin tratamiento y grupos experimentales a los que se les trató con cada uno de los péptidos bioactivos. Las características por grupo se muestran en la **Tabla 3**.

<b>E</b>	<b>GA</b>	<b>GB</b>	<b>GC</b>	<b>GD</b>
Esmalte sano	<b>Grupo control</b> Esmalte desmineralizado	Grupo tratado con quitosano.	Grupo tratado con quitosano y CEMP1-p3.	Grupo tratado con quitosano y CAP-p15.

Tabla 3. Clasificación de los grupos.

## Tratamiento de las superficies de esmalte con péptidos bioactivos y pH cíclico

En las muestras experimentales, de acuerdo a cada grupo, se aplicó de manera uniforme 20  $\mu$ L del hidrogel sobre la superficie del esmalte a tratar y se dejó desecar a temperatura ambiente.

Todas las muestras se mantuvieron en una solución desmineralizante ( $\text{CaCl}_2$  1.5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.9 mM, en un buffer de acetato 50 mM, y NaF 0.45 ppm a un pH 4.6) durante 6 hrs; posteriormente se cambiaron a una solución remineralizante ( $\text{CaCl}_2$  1.5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.9 mM, KCl 130 mM, NaF 0.45 ppm en buffer HEPES 20 mM con un pH de 7.2) durante 18 hrs. Entre cada cambio de solución, se aplicaron 20  $\mu$ L del hidrogel de manera uniforme dejándolo desecar a temperatura ambiente por 15 minutos.

Ambas soluciones se incubaron a una temperatura de 37°C durante 14 días siguiendo un ciclo como se muestra en la **Figura 3**.

Al término de los días de cultivo, las muestras se lavaron con agua desionizada por 50 seg y se desecaron a temperatura ambiente.

### **PH CÍCLICO**

37° por 14 días

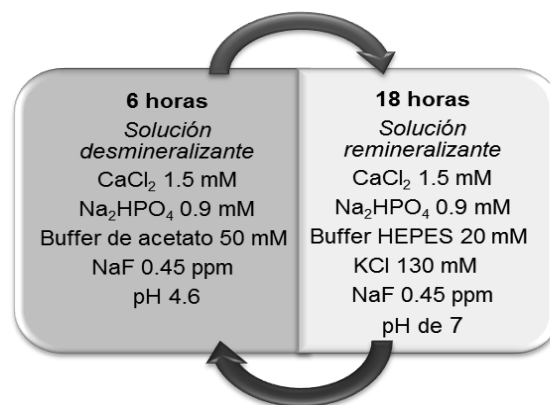


Figura 3. Esquema representativo del pH cíclico.

## Caracterización de los depósitos minerales

Se analizó la microestructura de los depósitos formados mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

La composición química de los depósitos se determinó mediante Espectroscopia molecular (EDS y Raman) (**Fig. 4**).

### Análisis de resultados

Cada experimento se realizó por triplicado y por lo menos tres veces. Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  la desviación estándar.

Los análisis de ajustes de datos lineales y no lineales se llevaron a cabo empleando el programa Graph Pad Prism TM.

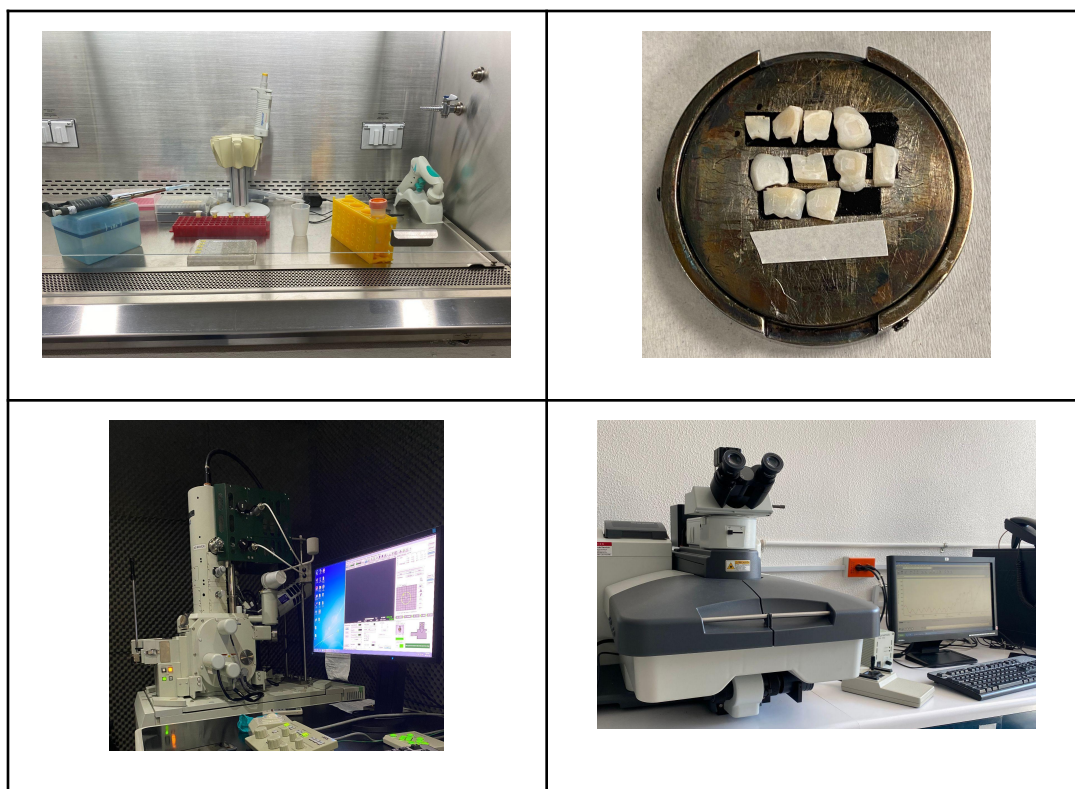


Figura 4. Fotos representativas del proceso que llevaron las muestras para el análisis mediante SEM, EDS y RAMAN.



## VIII. RESULTADOS

Para el desarrollo de este proyecto se seleccionaron dos péptidos, uno proveniente de la proteína del cemento 1 (CEMP1-p3) y una segunda secuencia aminoacídica derivada de la proteína de adhesión al cemento (CAP-p15). Las características fisicoquímicas de ambos péptidos se obtuvieron a partir de un análisis *in silico* mediante **Expasy**, **Scansite** y **GenScript** y se resumen en la **tabla 4**.

<u>Péptido</u>	<b>CEMP1-p3</b>	<b>CAP-p15</b>
<b>Secuencia</b>	QPLPKGCAAVKAEVGIPAPH	VSFPSCCFSIAVIFM
<b>Aminoácidos</b>	POLARES Sin carga: Q-C Positivos: K-H Negativos: E APOLARES P-L-G-A-V-I	POLARES Sin carga: S-C APOLARES V-F-P-I-A-M
<b>Punto Isoeléctrico Teórico</b>	8.21	5.48
<b>Peso Molecular</b>	1.98 kDa	1.65 kDa
<b>Índice Gravy</b>	0.06	2.033

Tabla 4. Características de las secuencias peptídicas CEMP1p-3 y CAPp-15.

**CEMP1-p3** es un péptido conformado por 20 aminoácidos: Q(9.09%), P(36.36%), L(9.09%), K(18.18%), G(18.18%), C(9.09%), A(36.36%), V(18.18%), E(9.09%), I(9.09%) y H(9.09%); en su mayoría polares, que le brindan una naturaleza hidrofílica (índice Gravy menor a 1). Esta secuencia presenta un punto isoeléctrico teórico (pI) de 8.21, lo cual nos indica que tiene un comportamiento alcalino, adquiriendo una carga positiva con capacidad de unirse a aniones (como fosfatos) en un medio fisiológico (pH 7.2).

Por otro lado, **CAP-p15** es un péptido conformado por aminoácidos como valina (V), serina (S), fenilalanina (F), prolina (P), cisteína (C), isoleucina (I), alanina (A) y metionina (M); que le brindan un comportamiento hidrofóbico.

Esta secuencia peptídica posee un punto isoeléctrico (pI) teórico de 5.48 y un peso molecular de 1.65 kDa mostrados en la **Tabla 4**, los cuales le confieren ciertas características relevantes como la baja probabilidad de desencadenar respuesta inmune debido a su bajo peso molecular; además, el punto isoeléctrico (pI) es un indicador de la carga negativa que el péptido adquiere al encontrarse en una disolución a un pH fisiológico (pH 7.4) debido a un proceso de desprotonación. Esta carga le permitiría interactuar con cationes como el calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ).

El índice de Gravy es un valor calculado a partir de una escala según el algoritmo de Kyte y Doolittle, que hace referencia al perfil hidrofóbico de una molécula; donde valores menores a 1 indica una naturaleza hidrofílica, mientras que un valor mayor a 1 es más bien hidrofóbica. En el caso de este péptido, se confirma que presenta un carácter hidrofóbico.

### Caracterización de las muestras de esmalte tratadas con los péptidos CEMP1-p3 y CAP-p15.

En el presente estudio, primero se llevó a cabo una caracterización de las superficies sometidas a un proceso de desmineralización con HCl (0.06 mol/L) que tuvo como propósito simular el efecto que sufre el esmalte dental de pacientes con trastorno alimenticio después de, aproximadamente, 4 meses de exposición al jugo gástrico. El análisis de la topografía y composición química elemental de las muestras se realizó con ayuda del microscopio de barrido “JSM-7800F Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope” del *Laboratorio Central de Microscopía, Instituto de Física (IF), UNAM.*<sup>62,63</sup>

Las imágenes obtenidas, a partir del análisis de MEB, de las muestras expuestas a la solución de HCl nos permiten observar una “ventana de desmineralización” de aproximadamente 4mm<sup>2</sup> y una profundidad de 40µm cuyos bordes están bien delimitados. Las lesiones se evidencian por una superficie químicamente homogénea con exposición de los prismas del esmalte, cuya morfología de “patrón de escamas” se debe al proceso de desmineralización al que fueron sometidos **(Fig. 5A)**.

A partir del protocolo de desmineralización, un grupo de muestras fueron recubiertas con el hidrogel de quitosano; y al evaluar dicho grupo de muestras **GB**, se pueden apreciar los prismas del esmalte en forma de escamas. Sin embargo, en aquellas muestras del grupo **GC** se observan muy pocos prismas expuestos sobre la superficie del esmalte; dicho recubrimiento parece encontrarse en toda la ventana desmineralizada. Mientras que en las superficies recubiertas del grupo **GD** ya no es posible observar la presencia de los prismas expuestos; observándose estructuras laminares de diferente tamaño dispersos en toda la superficie **(Fig. 5B-D)**. En el análisis EDS de todas las muestras **GA-GC** podemos observar la presencia de oxígeno, fosfato, calcio como elementos principales; sin embargo, también se detectaron la presencia de los elementos traza como sodio, cloro, flúor e incluso azufre. La relación de Ca/P, en prácticamente todas las muestras, no mostró diferencias. **(Tabla 5)**.

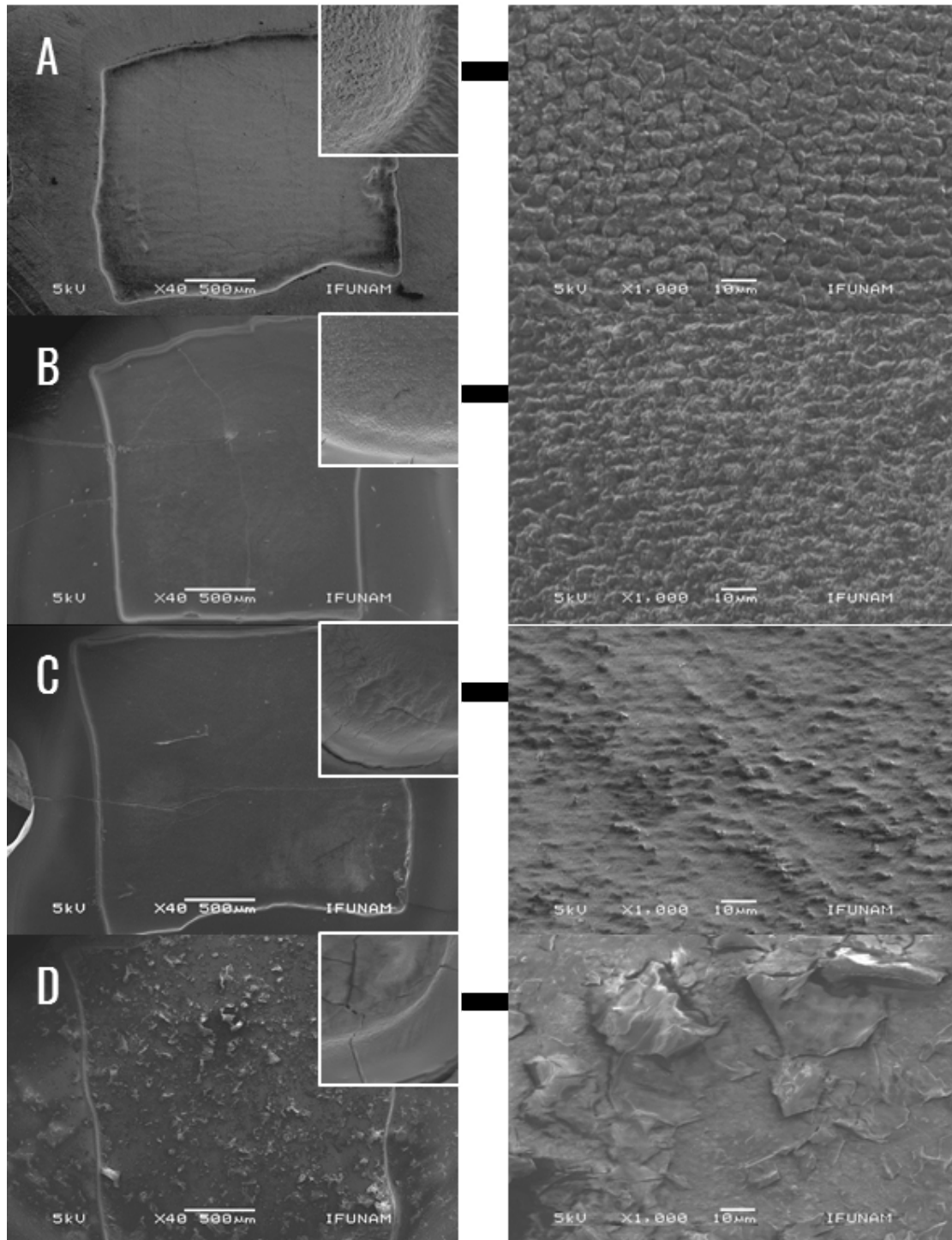


Figura 5. Micrografías obtenidas con MEB y resultados de EDS de las superficies expuestas a una solución desmineralizante (HCl 0.06 mol/L) donde se observa el patrón desmineralizante característico del esmalte dental en forma de “escamas” A. B muestra superficies tratadas con hidrogel de quitosano, mientras que en C y D ya no es posible observar el patrón en escamas debido a la presencia del hidrogel y los péptidos CEMP1-p3 y CAP-p15, respectivamente.

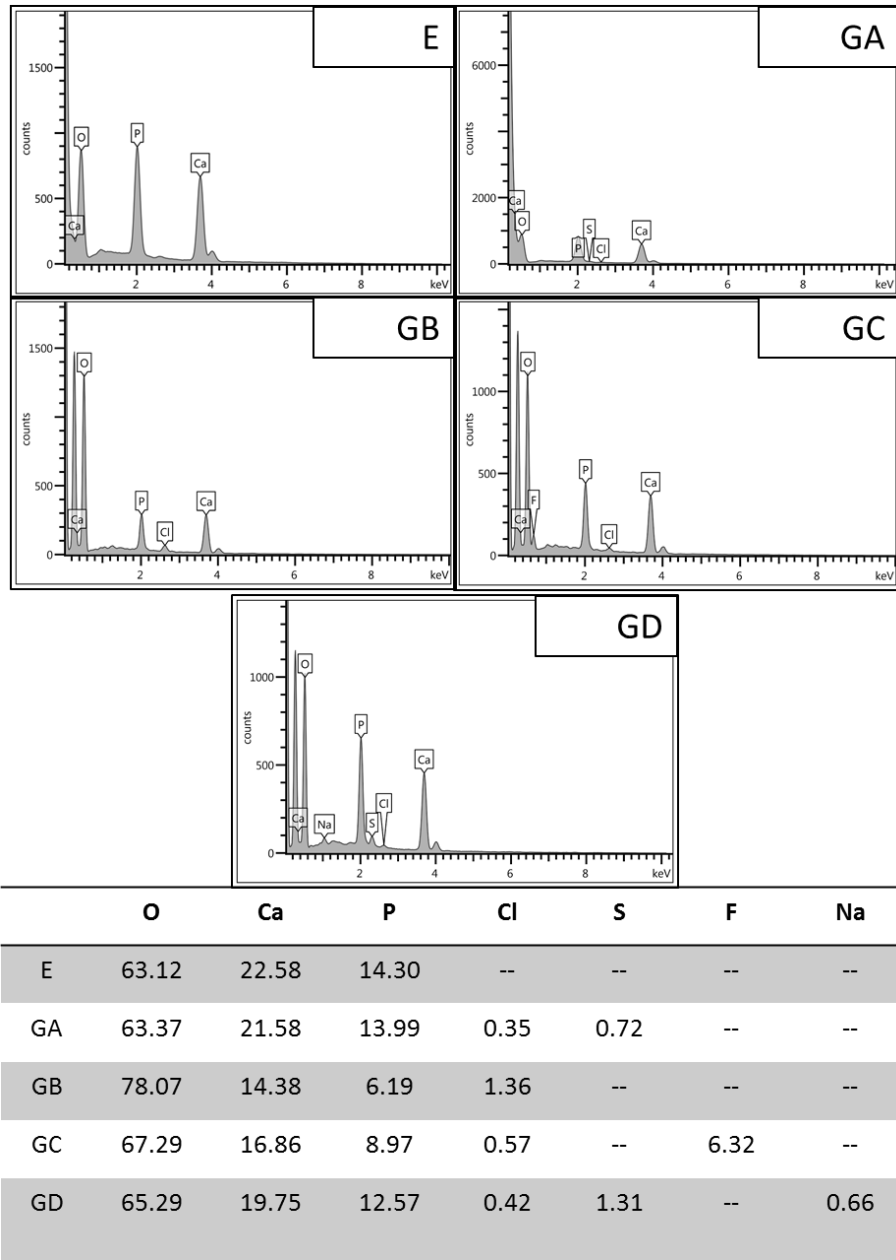


Figura 6 y Tabla 5. Resultados obtenidos de los grupos de muestras analizados mediante EDS, donde se observan los elementos encontrados por grupo y la gráfica representativa de los valores.

### Ensayo de mineralización de las muestras de esmalte tratadas con los péptidos CEMP1-p3 y CAP-p15.

Todas las muestras se incubaron en un sistema de pH cíclico durante 14 días a 37°C. Las imágenes de las muestras **GA** analizadas después del periodo de incubación nos dejaron ver una superficie uniforme con el mismo patrón de “escamas” característico de la desmineralización por erosión y donde el análisis de EDS no presentó algún cambio en la relación de Ca/P (1.62) (**Fig. 6A.1**).

Las superficies que fueron tratadas **GB** e incubadas en pH cíclico, presentan una topografía aparentemente homogénea donde aún es posible visualizar, de manera muy sutil, los prismas del esmalte. En este grupo la relación Ca/P arrojó un valor de 1.59 que es muy cercano a la reportada para la HA (**Fig. 6B.1**).

En el caso del grupo **GC** que fue incubado en pH cíclico, es posible observar algunos depósitos dispersos en toda la superficie cuya relación Ca/P es de 1.83. Mientras que, para el grupo **GD**, se observa la presencia de depósitos de diferentes dimensiones en forma de estratos y que recubren no solo toda el área de la superficie sino que rellenan el defecto, lo cual se evidencia por la pérdida de los bordes que delimitan la ventana de desmineralización. Esta capa de depósitos identificados mostraron una razón Ca/P de 1.62 la cual es compatible con HA<sup>64</sup> (**Fig 6C.1-D.1**).

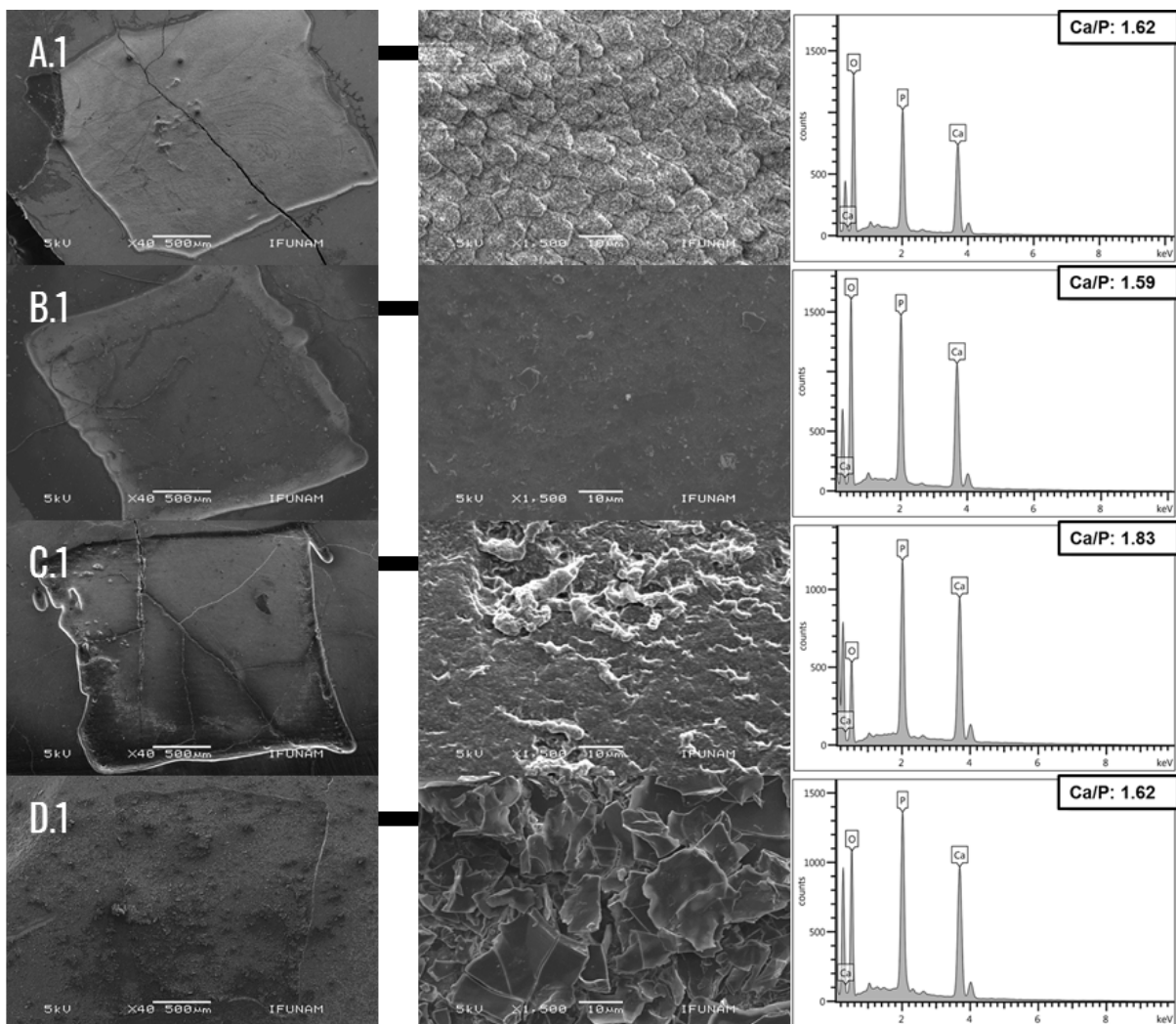


Figura 6. Micrografías obtenidas con MEB y resultados de EDS de las superficies expuestas a una solución desmineralizante (HCl 0.06 mol/L) y posteriormente a pH cíclico. Donde se observa el patrón desmineralizante característico del esmalte dental en forma de “escamas” A. B muestra superficies tratadas con hidrogel de quitosano, mientras que en C y D ya no es posible observar el patrón en escamas debido a la presencia del hidrogel y los péptidos CEMP1-p3 y CAP-p15, respectivamente.

Con el objetivo de determinar la composición química de los depósitos formados en las muestras después de la incubación en pH cíclico; se analizaron con el equipo “DXR RAMAN, Thermo Scientific”, con una longitud de onda de 780nm, una apertura de 25µm y un tiempo de adquisición de 10 segundos por cada muestra y se obtuvo un rango de 0-2000 cm<sup>-1</sup>. Diversos estudios de caracterización del esmalte, mediante espectroscopía de Raman, han reportado la presencia de picos intensos en 437 cm<sup>-1</sup>, 967 cm<sup>-1</sup> y 1051 cm<sup>-1</sup>, que corresponden al espectro característico de la HA; sin embargo, también es posible identificar otras bandas como 586 cm<sup>-1</sup>, 597 cm<sup>-1</sup>.

Los espectros obtenidos del esmalte sometido a erosión **GA** muestran la presencia de las bandas 440, 554 y 959 cm<sup>-1</sup>; mientras que las muestras tratadas con el quitosano **GB** presentan las bandas 446, 582, 958 y 1066 cm<sup>-1</sup>, y particularmente la presencia de 144 cm<sup>-1</sup> podría representar la presencia del quitosano. Por otro lado, los depósitos formados en las muestras del grupo **GC** nos permiten identificar la presencia de las bandas 444, 574, 836, 958 y 1079 cm<sup>-1</sup> y los depósitos formados por el efecto de CAP-p15 nos permite identificar las bandas 428, 585, 838, 958, 1079 y 1395 cm<sup>-1</sup>. (**Fig. 7**). En los grupos tratados con los péptidos, se observan bandas características del grupo PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> de la HA, pero que se encuentran “desplazados” o se registran diferencias en la amplitud o intensidad de la misma; lo que nos indica que la presencia de los péptidos inducen un cambio en la composición química de estos minerales.<sup>65</sup>



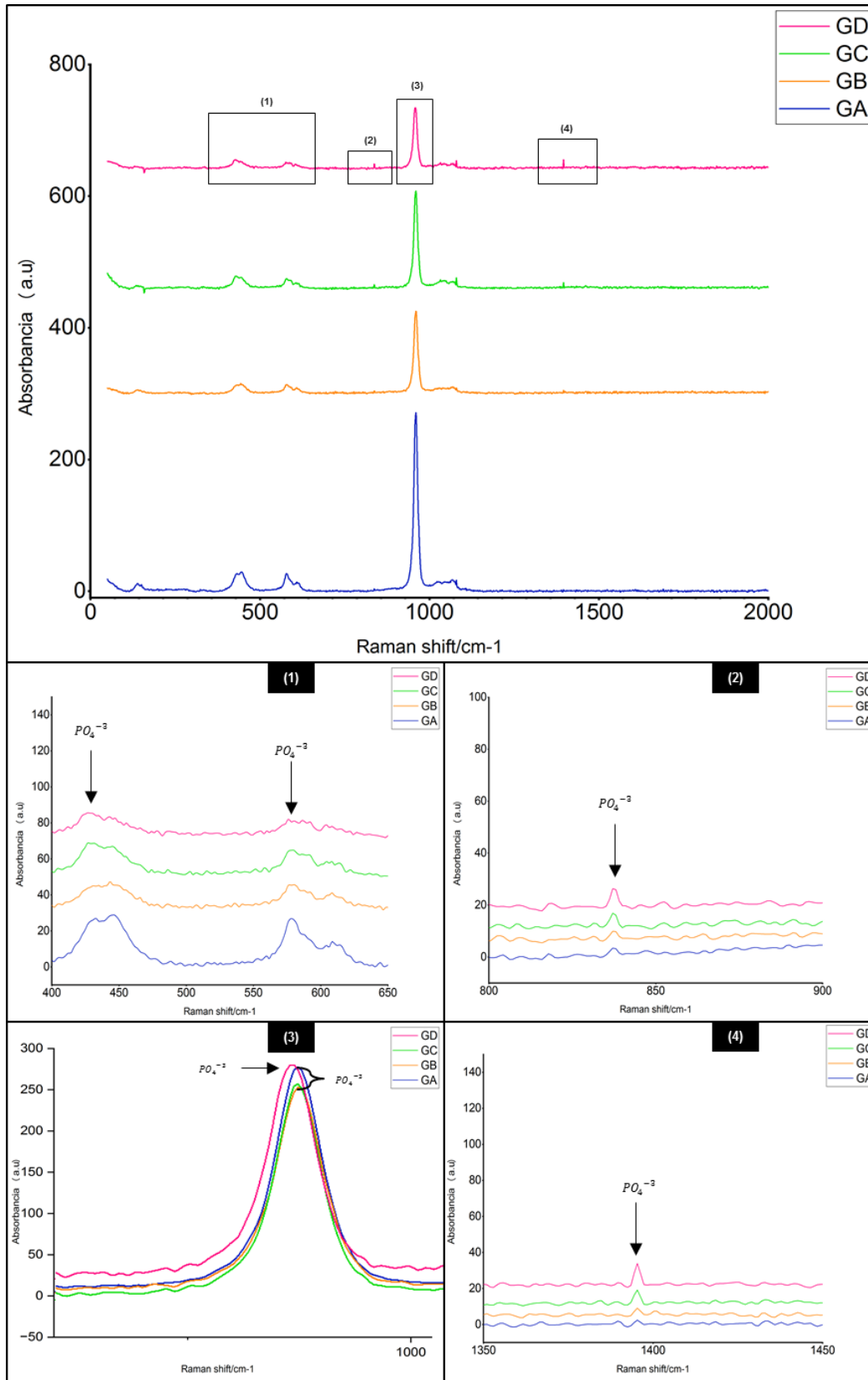


Figura 7. Análisis mediante espectroscopía RAMAN de los 4 grupos de muestras.

## IX. DISCUSIÓN

En la actualidad, se han desarrollado múltiples estudios enfocados en la remineralización del esmalte dental, empleando protocolos que simulen las condiciones que enfrenta el esmalte dentro de la cavidad bucal. En el presente estudio se empleó un protocolo que da lugar a un proceso de erosión que trata de mimetizar el proceso de desmineralización ocasionado por la exposición crónica del HCl en pacientes con trastornos alimenticios (bulimia). En este trabajo, empleamos un método fácil y práctico que causa la pérdida homogénea de estructura mineral de aproximadamente  $30\mu\text{m}$ , el cual es similar a la erosión reportada en la literatura y reconocida como lesiones de mancha blanca.<sup>67,68</sup> La caracterización mediante SEM de las lesiones por erosión nos muestra la típica morfología de “escamas” reportada en otros protocolos de desmineralización, e incluso, no se observaron cambios en la composición química elemental de la lesión. Estos hallazgos concuerdan con estudios realizados por Mukherjee, K. y colaboradores (2018), así como de los resultados obtenidos por Wang, D. y colaboradores en donde concluyen que la relación Ca/P no se vio modificada entre sus grupos de estudio.<sup>52,74</sup> Por lo tanto, el modelo empleado en este trabajo nos garantiza una superficie con prismas expuestos de manera regular.<sup>39</sup> Este método de desmineralización combinado con un sistema de pH cíclico es un buen modelo para simular las condiciones de pH en la cavidad oral.

Durante años se han estudiado múltiples agentes bioactivos enfocados en la prevención y tratamiento de la desmineralización del esmalte dental; siendo el fosfopéptido de caseína uno de los péptidos biofuncionales más reportado en la actualidad con estos fines remineralizantes.<sup>39</sup> La capacidad de este péptido se asocia a su capacidad para estabilizar los iones de calcio y fosfato en lesiones incipientes, permitiendo inducir la remineralización.<sup>69</sup> Por otro lado, el ácido poli- $\gamma$ -glutámico (PGGA) ha demostrado poseer una gran afinidad a la hidroxiapatita del esmalte dental; este biopolímero ha dado resultados benéficos

en los sistemas cíclicos de remineralización-desmineralización ya que inhibe la disolución de los cristales de hidroxiapatita.<sup>70</sup>

En este sentido, en el *Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados*, se han identificado péptidos bio-funcionales derivados de las proteínas CEMP1 y CAP, y que han demostrado tener la capacidad de regular la formación y el crecimiento de cristales de apatita de importancia biológica (OCP, HA) en diferentes modelos in vitro.<sup>44,52,54</sup> En este estudio, empleamos los péptidos CEMP1-p3 y CAP-p15 en combinación con un hidrogel de quitosano, el cual se ha demostrado que a una concentración del 0.2% es un buen agente que permite la inmovilización de biomoléculas de diferente naturaleza. Los resultados obtenidos muestran que el empleo del quitosano como un gel no generó cambios en la naturaleza química de la lesión y tampoco tuvo un efecto en la remineralización del esmalte erosionado; por lo que resultó ser un buen vehículo para la inmovilización de los péptidos empleados. Esta capacidad de poder interactuar con los péptidos bioactivos demuestran las bondades de este hidrogel, ya que al emplear tanto a CEMP-p3 (secuencia hidrofílica y de naturaleza alcalina) y a CAP-p15 (secuencia hidrofóbica y ácida) se observó que ambas secuencias fueron capaces de promover el depósito de minerales sobre el esmalte desmineralizado; esto pudiera explicarse a la capacidad del hidrogel de establecer interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas y que permiten la interacción con cationes (como el  $\text{Ca}^{+2}$ ) o aniones ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) que juegan un papel importante en la nucleación y crecimiento de minerales como las apatitas.

Si bien ambas secuencias mostraron la formación de precipitados sobre la superficie del esmalte, el empleo de CEMP-p3 mostró la formación de algunos cristales aislados; mientras que el empleo de CAP-p15 dio lugar al llenado de toda la lesión originada por el modelo de erosión endógena. Los depósitos observados en las muestras tratadas con este péptido nos dejan ver cristales en forma de placas y desorganizados. Hoy en día, el empleo de estrategias biomiméticas en la remineralización del esmalte no se ha reportado un crecimiento ordenado y de manera longitudinal en la superficie desmineralizada. Sólo algunos casos, se describe mediante imágenes la recuperación del patrón característico del esmalte

(en forma de “escamas de pescado” o “cerradura”).<sup>67,71</sup> Estudios realizados por Bouropoulos et al. 2001 y Aizenberg et al. 1995, concluyeron que la forma de los depósitos minerales refleja la naturaleza del entorno en el que crecen.<sup>72,73</sup>

La composición química superficial de las muestras se llevó a cabo mediante la técnica de EDS; el análisis demostró que los depósitos minerales formados por el efecto de ambos péptidos están formados principalmente de calcio y fosfato. Sin embargo, el análisis por EDS es muy localizado y semicuantitativo, por lo que se requiere de técnicas complementarias para la caracterización química de los depósitos formados.<sup>62</sup> En este trabajo, empleamos la espectroscopía Raman para determinar la composición química elemental, ya que se basa en la medición de la luz dispersada (obtención de bandas) el medir el estado de vibración de los grupos funcionales (estructura química) presentes en un material, al incidir un haz de luz monocromático.<sup>39</sup>

Los resultados obtenidos por Raman nos demuestran que los depósitos encontrados en las muestras tratadas con ambos péptidos están compuesto de hidroxiapatita. Sin embargo, se observan ligeros cambios en la intensidad y amplitud de las señales de los grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  asociados a la presencia de los péptidos biofuncionales. En estudios previos se han reportado que cristales inducidos con el péptido de CAP en un sistema libre de células, presentan bandas en 431  $\text{cm}^{-1}$ , 593  $\text{cm}^{-1}$ , 963  $\text{cm}^{-1}$  y 1011  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales corresponden a los cambios de energía inducidos por los iones de la Hidroxiapatita.<sup>66</sup> Wang y Cols identificaron la banda 962  $\text{cm}^{-1}$  en cristales de HA donde lo atribuyeron a un crecimiento ordenado y cristalino de esmalte remineralizado.<sup>75</sup>

Por lo anterior, los hallazgos de este estudio sugieren que los péptidos empleados con el hidrogel promueven el depósito de hidroxiapatita en esmalte desmineralizado.

## X. CONCLUSIONES

El protocolo de desmineralización empleado en el presente trabajo, simula la erosión endógena producida por la exposición crónica (4 meses) al HCl del jugo gástrico.

El péptido CEMP1-p3 es una secuencia hidrofílica y de naturaleza alcalina, mientras que CAP-p15 es un péptido hidrofóbico ácido, que al emplearse con un hidrogel de quitosano (vehículo), en un modelo de pH cíclico, nos permitió evaluar su efecto “remineralizante” en el tratamiento de lesiones por erosión endógena del esmalte dental.

El empleo de diferentes técnicas de caracterización fisicoquímica como MEB, EDS y espectroscopía RAMAN nos demostraron que ambos péptidos promueven la formación de cristales de HA; sin embargo, la aplicación de Cap-p15 promueve el llenado de la lesión producida por la erosión, aunque dichos cristales se observan de manera desordenada.

Considerando las limitaciones de este trabajo, creemos que sería importante probar diferentes concentraciones de los péptidos e incluso diferentes compuestos (agua desionizada, quitosano, etc) como vehículo que permita una mejor distribución, que dé lugar a la formación y crecimiento ordenado de depósitos cristalinos. Así como también, llevar a cabo pruebas mecánicas de los depósitos formados con la finalidad de valorar el poder de adhesión a la estructura del esmalte.

**XI. ANEXO**  
**CÓDIGO DE AMINOÁCIDOS**

Código de 1 letra	Código de 3 letras	Aminoácido
E	Glu	Ácido glutámico
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
C	Cys	Cisteína
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
Q	Gln	Glutamina
H	His	Histidina
I	Iso	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
Y	Tyr	Tirosina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
V	Val	Valina

## XII. REFERENCIAS

1. Cate, J. M. Ten. (1990). In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *Journal of Dental Research*, 69(2\_suppl), 614–619.
2. Milani, D. C., Borba, M., Farré, R., Grando, L. G. R., Bertol, C., & Fornari, F. (2022). Gastroesophageal reflux disease and dental erosion: The role of bile acids. *Archives of Oral Biology*, 139, 105429.
3. Mendoza J. y Nistal O. (1998). Impacto de los trastornos de la conducta alimentaria en el aparato masticatorio (Contribución del odontólogo a un diagnóstico precoz). *REVISTA AETCA*. 1(3).
4. Gay, O. Z. y Ramírez G.E. R. (2000). Anorexia y bulimia nerviosa. Aspectos odontológicos. *Asociación Dental Mexicana*. Vol. LVII(1) pp. 23-32.
5. García, R., Calderón, A., Zaragoza, M., Cruz, V., Moreno, A. (2008) Asociación entre microorganismos y la capacidad amortiguadora de la saliva con la caries dental de escolares. *Rev Odont Mex*; 12(4): 173-76.
6. Roesch-Ramos, L., Roesch-Dietlen, F., Remes-Troche, J. M., Romero-Sierra, G., Mata-Tovar, C. de J., Ali Azamar-Jácome, A., & Barranca-Enríquez, A. (2014). Dental erosion, an extraesophageal manifestation of gastroesophageal reflux disease: the experience of a center for digestive physiology in Southeastern Mexico. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 106(2), 92–97.
7. Castellanos, J., Marín-Gallón, L., Úsuga-Vacca, M., Castiblanco-Rubio, G., & Martignon, S. (2013). La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental. *Revista Científica Javeriana*, 32(69), 49–59.
8. Pandya, M., & Diekwisch, T. G. H. (2019). Enamel biomimetics—fiction or future of dentistry. *International Journal of Oral Science*, 11(1), 8.
9. Simancas-Escorcía, V. (2019). Fisiopatología de los odontoblastos: una revisión. *Duazary*, 16(3), 87–103.

10. Mohd Said, S. N. B., Ekambaram, M., & Yiu, C. K. Y. (2017). Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 27(3), 163–173.
11. Li, X., Wang, J., Joiner, A., & Chang, J. (2014). The remineralisation of enamel: a review of the literature. *Journal of Dentistry*, 42, S12–S20.
12. He LH, Swain M V. (2008). Understanding the mechanical behavior of human enamel from its structural and compositional characteristics. *J Mech Behav Biomed Mater*. 1(1):18–29.
13. Leyva, L. (2020). Remineralización del esmalte por métodos orgánicos e inorgánicos. Universidad Nacional Autónoma de México.
14. Vargas LE. (2000). Análisis in-situ de las estructuras fractales y conducción del esmalte dental humano. [Tesis para Doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México.
15. Anselmino, C., Dorati, P., & Lazo, G. (2017). Atlas de histología bucodental (Vol. 1). Universidad Nacional de la Plata.
16. Cid, C. (2019). Efecto de la microdureza del esmalte dental en condiciones de pH cíclico con una pasta remineralizante. [Tesis para Especialidad en Estomatología Pediátrica], Universidad Nacional Autónoma de México.
17. García, J. (2020). Erosión dental: Clasificación, etiología y alternativas de rehabilitación. Universidad Nacional Autónoma de México.
18. Gómez de Ferrariz, M. & Antonio, C. (2009). Histología y embriología bucodental. Editorial Médica Panamericana. México. 271-296.
19. Almeida PDV, Grégio AMT, Machado MÂN, de Lima AAS, Azevedo LR. (2008). Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. *J Contemp Dent Pract*. 9(3):072-080. Doi:10.5005/jcdp-9-3-72.
20. Dodds, M., Roland, S., Edgar, M., & Thornhill, M. (2015). Saliva A review of its role in maintaining oral health and preventing dental disease. *BDJ Team*, 2(1–8):11–13. doi:10.1038/bdjteam.2015.123.
21. Rosas, J. (2021). Alteraciones de la saliva en personas con diabetes. Universidad Nacional Autónoma de México.



22. Lyngge-Pedersen, A. & Belstrøm, D. (2019). The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *Journal of Dentistry*, 80: S3–S12. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.08>.
23. Dawes, C., Pedersen, A. M. L., Villa, A., Ekströ, J., Proctor, G. B., Vissink, A., Vissink. (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Arch Oral Biol.* 60(6):863-74. doi:10.1016/j.archoralbio.03.004.
24. Barembaum Silvina R, & Azcurra Ana I. (2019). La saliva: una potencial herramienta en la Odontología. *Rev FacOdont*, 29(2), 8–21. Retrieved from: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/RevOdonto/article/view/25250/24496>.
25. Hernández-Gil, I. (2016). Introducción al aparato digestivo. cavidad bucal. *Fisiología humana*, 4e. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/Content.aspx?bookid=1858&sectionid=134367955>.
26. J. Walsh L. (2008). Aspectos clínicos de biología salival para el clínico dental. *Revista de mínima intervención odontológica*.1 (1):5-11.
27. Ramírez, M. & Villavicencio N. (2017). Tratamiento para la desmineralización mediante microabrasión y blanqueamiento después del tratamiento ortodóntico. [Tesis para licenciatura], Universidad Autónoma del Estado de México.
28. Hernández-Molinar, Y., Aranda-Romo, S., Dávila-Pérez, C., & Goldaracena-Azuara, M. (2019). Prebióticos como bacterioterapia para fortalecer capacidad buffer y disminuir la viscosidad de saliva en pacientes pediátricos. *Facultad de Estomatología de la UASPL. Oral*, 1750–1754. <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2019/ora1964b.pdf>
29. Dorozhkin, S. (2019). Dental Applications of Calcium Orthophosphates (CaPO<sub>4</sub>). *Research*. 1. 024-054.
30. FDI General Assembly. (Septiembre 2007). Erosión Dental. <https://www.fdiworldental.org/es/erosion-dental>.
31. Cruz, A. (2022). Erosión dental en pacientes adultos con reflujo gastroesofágico. Universidad Nacional Autónoma de México.

32. Lussi, A & Jaeggi, T. (2008). Erosion, diagnosis and risk factors. *Clin Oral Investig.* 12(Suppl 1):S5-13.
33. Hernández, J. (2022). Factores extrínsecos relacionados con lesiones de erosión dental en adolescentes de 10 a 19 años. Una revisión sistemática. [Tesis de licenciatura], Universidad Nacional Autónoma de México.
34. Carrillo, A. (2012). Erosión Dental como manifestación de Enfermedad de Reflujo Gastroesofágico. *Odontología Pediátrica*, Vol. 11, pp.145-148.
35. Bermúdez-Durán LV, Chacón-Segura MA, Rojas Sancho DM. (2021). Actualización en trastornos de conducta alimentaria: anorexia y bulimia nerviosa. *Rev Med Sinerg.* 6(8).
36. Carvalho, T., Colón, P., Ganss, C., Huysmans, M., Lussi, A., Schlueter, N. & Schmalz, G. (2015). Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear—diagnosis and management, *Clin. Oral Invest.* 19 (7) 1557–1561.
37. Ferreira, M. A. F., & Mendes, N. S. (2005). Factors associated with active white enamel lesions. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 15(5), 327–334.
38. Panico, R., Piemonte, E., Lazos, J., Gilligan, G., Zampini, A., & Lanfranchi, H. (2018). Oral mucosal lesions in Anorexia Nervosa, Bulimia Nervosa and EDNOS. *Journal of Psychiatric Research*, 96, 178–182.
39. Ramírez, L. (2022). Revisión sistemática de literatura de péptidos promotores de la remineralización del esmalte dental. [Tesis para maestría], Universidad Nacional Autónoma de México.
40. Lynch, R. J. M., & Smith, S. R. (2012). Remineralization Agents – New and effective or just marketing hype? *Advances in Dental Research.* 24(2), 63–67.
41. Arzate, H., Zeichner-David, M., & Mercado-Celis, G. (2015). Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontology 2000*, 67(1), 211–233.
42. Serrano, J., Romo, E., Bermúdez, M., Narayanan, A. S., Zeichner-David, M., Santos, L., & Arzate, H. (2013). Bone regeneration in rat cranium

- critical-size defects induced by cementum protein 1 (CEMP1). PLoS ONE, 8(11), e78807.
43. Valdés De Hoyos, A., Hoz-Rodríguez, L., Arzate, H., & Narayanan, A. S. (2012). Isolation of protein-tyrosine phosphatase-like Member-a variant from cementum. *Journal of Dental Research*, 91(2), 203–209.
  44. Aguilar, V. (2022). Regeneración del defecto periodontal in vivo, inducido a través de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAPp-15). [Tesis de maestría] Universidad Nacional Autónoma de México.
  45. Komaki, M., Iwasaki, K., Arzate, H., Narayanan, A. S., Izumi, Y., & Morita, I. (2012). Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *Journal of cellular physiology*, 227(2), 649–657.
  46. Carmona-Rodríguez B, Álvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, et al. (2007). Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 358: 763–769. 27.
  47. Arzate, H. (1992). Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J*. 6(11): p. 2990-5.
  48. Bermúdez, M., Hoz, L., Montoya, G., Nidome, M., Pérez-Soria, A., Romo, E., Soto-Barreras, U., Garnica-Palazuelos, J., Aguilar-Medina, M., Ramos-Payán, R., & Villegas-Mercado, C. (2021). Bioactive synthetic peptides for oral tissues regeneration. *Frontiers in Materials*, 8.
  49. Hernández, S. (2016). Péptido derivado de CAP para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo animal. [Tesis para maestría], Universidad Nacional Autónoma de México.
  50. Montoya G. (2011). La proteína recombinante de adhesión del cemento radicular (hrCAP) induce la diferenciación de células troncales derivadas del ligamento periodontal humano y regula el proceso de mineralización in vitro. [Tesis para maestría], Universidad Nacional Autónoma de México.

51. Montoya, G., Arenas, J., Romo, E., Zeichner-David, M., Álvarez, M., Narayanan, A. S., Velázquez, U., Mercado, G., & Arzate, H. (2014). Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. *Bone*, 69, 154–164.
52. Santana, M., Montoya, G., Herrera, R., Hoz, L., Romo, E., Zamora, C., Wintergerst, A., & Arzate, H. (2020). Cemp1-p3 peptide promotes the transformation of octacalcium phosphate into hydroxyapatite crystals. *Crystals*, 10(12), 1131.
53. Musat, V., Anghel, E., Zaharia, A., Atkinson, I., Mocioiu, O., Busilă, M. & Alexandru, P. (2021). A Chitosan–Agarose Polysaccharide-Based Hydrogel for Biomimetic Remineralization of Dental Enamel. *Biomolecules*. 11, 1137.
54. Ureiro C. Guadalupe. (2020). Papel de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) en la funcionalización de superficies de titanio y óxido de titanio. (Tesis de maestría), Universidad Nacional Autónoma de México.
55. Raafat, D. & Sahl, H.G. (2009). Chitosan and Its Antimicrobial Potential-A Critical Literature Survey. *Microb. Biotechnol.* 2, 186–201.
56. Fariasa, J.M.; Stamford, T.C.M.; Resende, A.H.M.; Aguiard, J.S.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Sarubbo, L.A. (2019). Mouthwash containing a biosurfactant and chitosan: An eco-sustainable option for the control of cariogenic microorganisms. *Int. J. Biol. Macromol.* 129, 853–860.
57. Persadmehr, A.; Torneck, C.D.; Cvitkovitch, D.G.; Pinto, V.; Talior, I.; Kazembe, M.; Shrestha, S.; Mcculloch, C.A.; Kishen, A. (2014). Bioactive chitosan nanoparticles and photodynamic therapy inhibit collagen degradation in vitro. *J. Endod.* 40, 703–709.
58. Lee, H.-S. et al. (2012). Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion. *J. Colloid Interface Sci.* 385, 235–243.
59. Araiza M. (2014). Efficiency of fluoride-containing compounds on remineralization of carious enamel lesions under cyclic pH conditions. *Revista Odontológica Mexicana.* 2(18), págs. 96-104.

60. Ipohorski, M. & Bozzano, P. (2018). MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN LA CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES. *Ciencia e investigación*. 63(3).
61. Afonso, E., Martínez-Gómez, A., Tiemblo, P. & García, N. (2020). La perfilometría óptica como técnica de caracterización topográfica no destructiva y sin contacto. *REVISTA DE PLÁSTICOS MODERNOS*. 120(758).
62. Yacamán, M., Reyes J. (1995). *Microscopía electrónica: una visión del microcosmos*. Fondo de Cultura Económica, 143 páginas, ISBN 9681646215.
63. Oliveira, J., Menezes, M., Dovigo, N., & García, R. (2022). Long-term effects of simulated gastric juice alternated with brushing on hardness, substance loss, flexural strength and reliability of CAD-CAM monolithic materials. *Journal of Applied Oral Science* vol. 30. Published by Faculdade De Odontologia De Bauru, USP.
64. Correa, R. (2016). *Nucleación y/o inhibición del proceso de mineralización in vitro a partir de péptidos derivados de proteínas del cemento*. (Tesis de maestría), Universidad Nacional Autónoma de México.
65. Barrera-Ortega, C., Vazquez, A., Berrú, R. & Pineda, I. (2022). Application of Raman Spectroscopy for Dental Enamel Surface Characterization. 10.5772/intechopen.108013.
66. Montoya, G. (2015). *Estudio de cristales inducidos con el péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular (cap) en un sistema libre de células*. (Tesis de doctorado), Universidad Nacional Autónoma de México.
67. Wang D, Deng J, Deng X, Fang C, Zhang X, Yang P. (2020). Controlling Enamel Remineralization by Amyloid-Like Amelogenin Mimics. *Adv Mater*. 32(31):1–13.
68. Ruan, Q., Liberman, D., Bapat, R., Balakrishna, K., Phark, J., Moradian-Oldak, J. (2016). Efficacy of amelogenin-chitosan hydrogel in biomimetic repair of human enamel in pH-cycling systems. *Journal Metrics*.

69. Reynolds EC. (1997). Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res.* 76(9):1587–95.
70. Qamar Z, Haji Abdul Rahim ZB, Neon GS, Chew HP, Zeeshan T. (2019). Effectiveness of poly- $\gamma$ -glutamic acid in maintaining enamel integrity. Vol. 106, *Archives of Oral Biology*.
71. Kamal D, Hassanein H, Elkassas D, Hamza H. (2020). Complementary remineralizing effect of self-assembling peptide (P11-4) with CPP-ACPF or fluoride: An in vitro study. *J Clin Exp Dent.* 12(2):e161–8.
72. Aizenberg, J., Hanson, J., Ilan, M., Leiserowitz, L., Koetzle, TF., Addadi, L. & Weiner, S. (1995). Morphogenesis of calcitic sponge spicules—a role for specialized proteins interacting with growing crystals. *FASEB J* 9: 262–268.
73. Bouropoulos, N., Weiner, S., Addadi, L. (2001). Calcium oxalate crystals in tomato and tobacco plants: morphology and in vitro interactions of crystal-associated macromolecules. *Chem Eur J* 7: 1881–1888.
74. Mukherjee K, Ruan Q, Nutt S, Tao J, De Yoreo JJ. & Moradian-Oldak J. (2018). Peptide-Based Bioinspired Approach to Regrowing Multilayered Aprismatic Enamel. *ACS Omega*.3. (3):2546–57.
75. Simmer JP, Fincham AG. (1995). Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 6(2):84–108.