



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

## **PAPEL DE UN PÉPTIDO DERIVADO DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR (HACD1/CAP) EN LA FORMACIÓN Y CRECIMIENTO DE OXALATO DE CALCIO E HIDROXIAPATITA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**KEVIN LÓPEZ BARRIOS**

TUTOR

DR. GONZALO MONTOYA AYALA  
POSGRADO DE ODONTOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

JULIO, 2018.



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.

---

## JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Profesora:	ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS
VOCAL	Profesora:	MARGARITA RIVERA HERNÁNDEZ
SECRETARIO	Profesor:	GONZALO MONTOYA AYALA
SUPLENTE	Profesor:	MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
SUPLENTE	Profesor:	JESÚS ÁNGEL ARENAS ALATORRE

ESTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN LA UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL.

Tutor: DR. GONZALO MONTOYA AYALA \_\_\_\_\_

Sustentante: KEVIN LÓPEZ BARRIOS \_\_\_\_\_

---

---

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), su personal académico y trabajadores en general, por la formación académica y profesional proporcionada durante el estudio de la Maestría en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada que permitió desarrollar y concluir este proyecto. **Numero de becario: 712649.**

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo con clave **IA200917**, otorgado para el desarrollo del trabajo de tesis.

A la unidad de Posgrado de la Facultad de Odontología de Ciudad Universitaria, por las facilidades otorgadas en la realización de este proyecto de investigación.

---

---

## AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

Al Dr. Gonzalo Montoya Ayala, por su guía, ayuda, compromiso, paciencia y profesionalismo. Sin su liderazgo y conocimientos, no hubiera sido posible concretar este proyecto. Y aun teniendo puntos de vista diferentes para resolver un mismo problema, logramos trabajar como equipo para salir adelante.

Al Dr. Higinio Arzate, así como a mis compañeros de laboratorio: el Dr. Enrique, la Dra. Lia, la Dra. Rita, la Dra. Fabiola, la Lic. María de Jesús, el maestro Rodrigo, la maestra Sonia, el maestro Mikado, el C. D. Edgar, la C.D. Paola, la C.D. Guadalupe, el C.D. Ali y la C.D. Dina, por sus consejos, compañerismo, solidaridad, paciencia y buenos momentos.

A la Dra. Santa Rita Arroyo Cruz, aun sin tener ningún tipo de compromiso o responsabilidad, únicamente por convicción y compañerismo, me apoyo en secciones vitales del proyecto y me brindo su amistad de manera desinteresada. No creo que este agradecimiento pueda hacer justicia al gesto que has tenido conmigo. Gracias amiga.

Al M. en C. Manuel Aguilar Franco del Laboratorio de Microscopía Electrónica en el Instituto de Física (IF), UNAM, por sus aportes a este proyecto con las técnicas de microscopía de fuerza atómica y microscopía electrónica de barrido.

A la Dra. Karina Jiménez Duran del Laboratorio de Microscopía Confocal en la Unidad de Servicios de Apoyo a la investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química (FQ), UNAM, por sus aportes a este proyecto con la técnica de microscopía confocal.

A la Dra. Ana María Fernández Presas, a la Dra. Margarita Rivera Hernández, al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez y al Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre, por sus aportaciones en la mejora de este escrito.

---

---

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis compañeros de generación en la maestría: Oscar, Rafael, Mikado y Paloma, por todo el compañerismo y buenos momentos aun en los períodos más complejos de esta parte de mi vida. Ustedes me enseñaron que la vida es un riesgo.

A mis amigos: Héctor, Alfonso, Monserrat, Vanessa, Janeth, Enrique, Karina, Silvia, Gabriel, Zulema, porque aun cuando ha pasado tanto tiempo desde que los conocí por primera vez, siguen ayudándome a entender esta travesía llamada vida. Sin lugar a dudas, ustedes son mis amigos.

A Génesis, te doy gracias por compartir tu tiempo, tus recuerdos, tus secretos, tu comida y tu vida en general conmigo, todo ello es irremplazable y apreciado para mí. Gracias por tu apoyo, comprensión, paciencia y honestidad. Sé que puedo confiar y contar contigo. Conocerle ha hecho aún más feliz.

Por último, pero no por ello menos importante, a mi familia, pero en especial a mi mamá Aurora, a mi papá Isidro y a mi hermanita Kelly. Los amo con todo mí ser. Sin ustedes, yo no sería la persona quien soy. Sin ustedes, no podría haber llegado hasta donde me encuentro. Sé que me son incondicionales así como yo lo soy con ustedes. El máximo agradecimiento, aún insuficiente, que tengo hacia ustedes es tomar las riendas de mi camino de aquí en adelante y hacer lo que ustedes me han inspirado. Yo lo tengo todo, todo lo mejor y ustedes tres son todo lo que tengo, aun cuando sólo sean prestados. Gracias por acompañarme y dejarlos acompañar.

---

---

*«La ciencia es una forma de pensar, mucho más que un conjunto de conocimientos.»*  
*«La ciencia no es perfecta, con frecuencia se utiliza mal, no es más que una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos, se corrige a sí misma, está siempre evolucionando y se puede aplicar a todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible.»*

Carl Sagan

*«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

	Página
Lista de abreviaturas	1
Resumen	3
Abstract	5
Introducción	7
Mineralización	7
Biom mineralización	9
Minerales de origen patológico en el cuerpo humano	14
Péptidos en la biom mineralización	16
Planteamiento del problema	19
Hipótesis	20
Objetivo	20
Objetivos específicos	20
Metodología	21
Selección y síntesis del péptido	21
Caracterización fisicoquímica del péptido	21
Autoensamble del péptido	22
Ensayos de cristalización de hidroxiapatita	22
Ensayos de crecimiento cristalino por composición constante	22
Adsorción en cristales de hidroxiapatita	23
Ensayos de cristalización de oxalato de calcio	23
Adsorción en cristales de oxalato de calcio	23
Ensayos de microscopia electrónica de barrido	24
Efecto del péptido sobre osteoblastos humanos	24
Efecto del péptido sobre la deposición de nódulos de calcio	24

---



---

Actividad específica de fosfatasa alcalina	25
Expresión génica a nivel transcripcional	25
Análisis estadístico	26
<b>Resultados</b>	<b>27</b>
Caracterización fisicoquímica del péptido	27
Ensayos de cristalización de hidroxiapatita	31
Ensayos de crecimiento cristalino por composición constante	32
Adsorción en cristales de hidroxiapatita	35
Ensayos de cristalización de oxalato de calcio	37
Adsorción en cristales de oxalato de calcio	37
Efecto del péptido sobre osteoblastos humanos	40
Efecto del péptido sobre la deposición de nódulos de calcio	41
Actividad específica de fosfatasa alcalina	43
Expresión génica a nivel transcripcional	44
<b>Análisis de resultados</b>	<b>48</b>
<b>Conclusión</b>	<b>54</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>54</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>55</b>

---

## Lista de abreviaturas

ALP	Fosfatasa alcalina
AMP	Adenosina monofosfato
AMPasa	Enzima 5`-nucleotidasa
ANOVA	Análisis de varianza
ARF6	Factor ADP-ribosilación 6
Asp	Ácido aspártico
ASRM	Motivo ácido serina y rico en aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
ATPasa	Enzima de hidrólisis de ATP
BMP II	Proteína morfogenética ósea 2
BSP	Sialoproteína ósea
$C_2O_4^{2-}$	Ion oxalato
$Ca(NO_3)$	Nitrato de calcio
$Ca(PO_3OH) \cdot 2(H_2O)$	Brushita
$Ca^{2+}$	Ion calcio
$Ca_9Mg(PO_3OH)(PO_4)_6$	Withlokita
CBFA1	Factor de diferenciación de osteoblastos
CD42	Glicoproteína Ib
CEMP1	Proteína del cemento radicular 1
Da	Dalton
DAB	Diaminobencidina
DCPD	Brushita
DED	Región aspartato-ácido glutámico-aspartato
DEMEM	Medio mínimo esencial Dulbecco modificado de Eagles
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FMOC	Cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Gla	Ácido $\gamma$ -carboxiglutámico
Glu	Ácido glutámico
GTPasa	Enzima de hidrólisis de GTP
H <sub>2</sub> O	Agua
HA	Hidroxiapatita
HACD1/CAP	Proteína de adhesión al cemento radicular
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
hr	Hora
hrs	Horas
JNK-MAPK	Proteínas quinasas activadas por estrés-Proteínas quinasas activadas por mitógenos
M	Molar
MFA	Microscopía de fuerza atómica
mg	mili gramos
MGP	Proteína de la matriz Gla
min	minutos
mM	mili Molar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
mV	mili Volt

---

mW	Mili Watts
NaCl	Cloruro de sodio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Bifosfato de sodio
nm	Nanometros
°C	Grados Celcius
OCN	Osteocalcina
OCP	Fosfato octa cálcico
OPN	Osteopontina
OSX	Osterix
OxCa	Oxalato de calcio
p-38	p38 proteínas quinasas activadas por mitógenos
PDL	Células del ligamento periodontal
pH	Potencial de Hidrogeno
pI	Punto isoelectrico
pKa	Constante de disociacion ácida
PNP	P-nitrofenil fosfato
poliASP	Ácido poliaspártico
PPi	Pirofosfato
PPiase	Enzima de hidrólisis de pirofosfato
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
Rac	Enzima pequeña de hidrólisis de GTP
RDG	Ácido arginilglicilaspártico
Rho	Enzima pequeña de hidrólisis de GTP
rpm	Revoluciones por minuto
Runx 2	Factor de diferenciacion de osteoblastos
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
Smad 1	Proteina mensajera intracelular 1
Smad 4	Proteina mensajera intracelular 4
Smad 5	Proteina mensajera intracelular 5
TBS	Solución salina tamponada con Tris
tBu	Tert-Butilo
TGF-beta	Factor de crecimiento transformante beta
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano-hidroclorado
UPTF1	Fragmento de protrombina urinaria 1
VB	Vesicula de biomineralización
WHT	Withlokita
µg	Micro gramo
µL	Micro litro

---

---

## Resumen

La biomineralización es un proceso altamente controlado, en el cual, los organismos son capaces de generar minerales. Este proceso puede llevarse a cabo a través de la nucleación homogénea, donde únicamente participan componentes inorgánicos de la fase mineral, o a partir de la nucleación heterogénea, en la que macromoléculas orgánicas como proteínas, regulan el proceso de mineralización. En seres humanos la nucleación heterogénea es la más común.

Células osteogénicas como osteoblastos, odontoblastos, cementoblastos, ameloblastos y condrocitos llevan a cabo el proceso de biomineralización, mediante la liberación de vesículas donde convergen los componentes inorgánicos, así como los componentes orgánicos, es decir proteínas, que dan origen a la formación de los biominerales como hidroxiapatita, e incluso, se puede llevar a cabo el proceso de biomineralización de manera ectópica (patológico) influenciado por altas concentraciones de iones, en regiones de baja fluencia de líquidos y donde posiblemente hay deficiencia de proteínas que regulen la formación de cristales dando como resultado la formación de depósitos de calcio, principalmente de oxalato de calcio dihidratado.

Los usos de las proteínas involucradas en la biomineralización han sido estudiados y propuestos para terapias con la intención de acelerar y mejorar la formación de hueso. Sin embargo, debido a las propiedades fisicoquímicas inherentes de las proteínas como su peso molecular, su alto costo de producción, complejidad técnica para su purificación y su posible papel para desencadenar la respuesta inmune, las hacen poco atractivas, por lo que, en la actualidad, el empleo de péptidos biofuncionales surgen como una alternativa prometedora.

---

En el presente trabajo, se empleó un péptido derivado de la proteína HACD1/CAP seleccionada a través de un análisis con cuatro distintos softwares para identificar dominios consenso de proteínas involucradas en la biomineralización. Se realizaron estudios de formación y crecimiento de cristales de hidroxapatita adicionando distintas concentraciones del péptido, observando una inhibición en ambos procesos. Al obtener este resultado, se decidió evaluar el efecto del péptido sobre la formación de cristales de oxalato de calcio, observando un comportamiento inhibitorio. Mediante microscopía confocal, se determinó que el péptido se adsorbe preferentemente en caras cristalinas. A través de estudios de microscopía electrónica de barrido, se demostró que la interacción entre el péptido y cristales de oxalato calcio, provocan defectos en las caras de crecimiento cristalino. Se realizaron ensayos para determinar el efecto del péptido en cultivo de osteoblastos humanos, se demostró que el péptido no afecta la proliferación de los osteoblastos. Los resultados de la deposición de nódulos de calcio mostraron que los osteoblastos cultivados en presencia del péptido producían una menor cantidad de estos nódulos en comparación con el grupo control. En las pruebas de actividad específica de Fosfatasa alcalina (ALP), los grupos de osteoblastos cultivados en presencia del péptido mostraron una menor actividad de ALP en comparación con el grupo control. En cuanto al nivel de expresión de proteínas involucradas en la biomineralización (BSP, BMP II, CEMP1, HACD1/CAP, OSX), los resultados obtenidos no muestran un efecto negativo en el nivel de expresión de estas proteínas.

---

## Abstract

Biom mineralization is a highly controlled process, by which organisms are able to generate minerals. This process can be carried out through homogeneous nucleation, where only inorganic components of the mineral phase participate, or from heterogeneous nucleation, in which organic macromolecules as proteins, regulate the mineralization process. In humans, heterogeneous nucleation is the most common.

Osteogenic cells such as osteoblasts, odontoblasts, cementoblasts, ameloblasts and chondrocytes carry out the process of biom mineralization, through the release of vesicles where the inorganic components converge, as well as the organic components, ie proteins, that give rise to the formation of biom minerals as hydroxyapatite, and even, the process of biom mineralization can be carried out in an ectopic (pathological) way influenced by high concentrations of ions, in regions of low fluency and where there is a deficiency of proteins that regulate the formation of crystals giving the formation of calcium deposits, mainly calcium oxalate dihydrate.

The proteins uses involved in biom mineralization have been studied and proposed for therapies with the intention of accelerating and improving bone formation. However, due to the inherent physicochemical properties of proteins such as their molecular weight, their high production cost, technical complexity for their purification and their possible role triggering the immune response, they make them unattractive, which is why, at present, the use of biofunctional peptides emerge as a promising alternative.

---

In the present work, a peptide derived from the HACD1 / CAP protein was selected through an analysis with four different softwares to identify consensus domains of proteins involved in biomineralization. Studies of formation and growth of hydroxyapatite crystals were carried out adding different concentrations of the peptide, observing an inhibition in both processes. With this result, it was decided to evaluate the effect of the peptide on the formation of calcium oxalate crystals, observing an inhibitory behavior. By confocal microscopy, it was determined that the peptide is preferentially adsorbed on crystalline faces. Through scanning electron microscopy studies, it was demonstrated that the interaction between the peptide and calcium oxalate crystals, cause defects in the faces of crystalline growth. Trials were conducted to determine the effect of the peptide in human osteoblast culture, it was shown that the peptide does not affect the proliferation of osteoblasts. The results of calcium nodule deposition showed that osteoblasts cultured in the presence of the peptide produced a smaller amount of these nodules compared to the control group. In the alkaline phosphatase (ALP) specific activity tests, the groups of osteoblasts cultured in the presence of the peptide showed a lower activity of ALP compared to the control group. Regarding the level of expression of proteins involved in biomineralization (BSP, BMP II, CEMP1, HACD1 / CAP, OSX), the results obtained do not show a negative effect on the level of expression of these proteins.

---

## Introducción

- Mineralización

Un mineral es una sustancia natural sólida e inorgánica, de composición química definida, la cual, puede poseer una estructura cristalina. La formación de un cristal comienza con la nucleación, es decir, una región en la cual convergen los componentes iónicos de la fase mineral formando una celda unitaria inicial a partir de la cual el cristal puede crecer <sup>[1]</sup>. La formación de este núcleo es debida a un exceso de solutos (iones) en una disolución que, debido a fluctuaciones como choques térmicos, eléctricos o bien a impurezas en el medio, comienzan a interactuar entre ellos hasta formar un producto, en el que hay un cambio de fase de líquido a sólido de baja solubilidad y que puede precipitar <sup>[2, 3]</sup>. Existen dos modalidades de nucleación:

La nucleación homogénea se refiere al proceso en el cual únicamente los iones que forman la fase mineral se encuentran presentes en el sistema. Ocurre en disoluciones saturadas y sobre saturadas. Tienden a necesitar de una gran cantidad de tiempo para que se lleven a cabo <sup>[3, 4]</sup>.

La nucleación heterogénea se refiere al proceso en el cual además de las partículas que conforman al cristal, existen moléculas de diferente naturaleza que pueden acelerar o modular el proceso de nucleación. Estas moléculas extrañas quedan incluidas dentro del nuevo cristal como impurezas. En los seres vivos, este es el proceso por el cual se originan las diferentes fases minerales como magnetita en los magnetosomas de bacterias, el carbonato de calcio en los exoesqueletos de los moluscos o la hidroxiapatita en los huesos de vertebrados. Estos biominerales poseen características como tamaño, forma y cristalinidad que son distintas de sus equivalentes abióticamente formados. En todos estos procesos de biomineralización participan proteínas que promueven y regulan este proceso <sup>[2, 5, 6]</sup>.



---

A partir de los núcleos se inicia el crecimiento de los cristales siempre que las condiciones del medio lo favorezcan (tiempo, estabilidad termodinámica, temperatura, pH). Alrededor del núcleo, existen disposiciones a partir de las cuales es más sencilla la adición de nuevos iones, las denominadas caras de crecimiento cristalino. La tendencia general de los iones en disolución es llenar huecos, completar caras, terminar caras y formar nuevas caras de crecimiento cristalino. El crecimiento real de los cristales se separa de este modelo ideal, produciéndose lo que se denomina defectos cristalinos <sup>[7, 8]</sup>.

La cristalización nunca es perfecta. Como en cualquier proceso natural se producen imperfecciones en el crecimiento. Estas imperfecciones reciben el nombre de defectos cristalinos, y son responsables de variaciones en el color o la forma de los cristales. Algunos de los defectos cristalinos son <sup>[9, 10]</sup>:

Vacancias. Se producen por la ausencia de la red de un elemento. Las vacancias, al igual que otros defectos pueden desplazarse libremente a lo largo de la red.

Átomos intersticiales: Inclusión en la red de un átomo fuera de las posiciones reticulares. Con frecuencia este defecto se presenta unido a una vacancia, pues la formación de una vacante favorece la aparición de un átomo intersticial.

Sustituciones. Entrada en la red de un átomo diferente, pero de similar radio iónico que el que la compone. Pueden dar lugar a la aparición de series isoformas.

Dislocaciones: Aparición de nuevas filas de elementos cuando en el plano anterior no existía. Una dislocación de este tipo son las dislocaciones helicoidales, que permiten un crecimiento rápido de una cara, pues esta nunca se acaba.

---

- Biomineralización

La biomineralización es un proceso altamente controlado mediante el cual los seres vivos son capaces de producir estructuras minerales. En los humanos este proceso se lleva a cabo naturalmente para generar huesos y dientes en donde el mineral hidroxiapatita es el componente inorgánico de mayor relevancia<sup>[11]</sup>. Las células que llevan a cabo el proceso de biomineralización son los osteoblastos, odontoblastos, cementoblastos y condroblastos<sup>[12]</sup>. Es en estas células donde los componentes que promueven la biomineralización convergen en vesículas de biomineralización (VB). Las VB más estudiadas hasta el momento son las provenientes de osteoblastos. Las VB se forman a partir de la membrana plasmática de la célula osteogénica gracias a la acción de pequeñas GTPasas como Rac, Rho, CD42, o ARF6, proteínas que regulan los rearrreglos corticales de la actina del citoesqueleto<sup>[13]</sup>. La bicapa lipídica de las VB es similar en cuanto al contenido de colesterol y esfingomielina, sin embargo, posee una alta concentración de lípidos de carga negativa que funcionan como puntos de atracción para el catión calcio durante la mineralización<sup>[14]</sup>. De igual manera, las VB poseen en su superficie una alta concentración de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) y adenosina monofosfatasa (AMPasa) que aumentan la concentración de grupos fosfato en el interior de la vesícula debido a que ambas hidrolizan adenosina monofosfato (AMP)<sup>[15, 16]</sup>. El AMP presente en las VB es producto de hidrólisis de ATP por parte de las ATPasas<sup>[17]</sup> que además producen pirofosfato (PPi), un inhibidor de la formación de minerales<sup>[18]</sup>. Este efecto del PPi es inhibido por la pirofosfatasa inorgánica (PPiase) debido a que hidroliza a PPi para incorporarlo en el mineral que se encuentra en formación<sup>[17, 18]</sup>. Así mismo, las VB poseen una alta concentración de Anexinas II, V y VI; mientras que anexina V es un canal de transporte de cationes calcio que favorece el proceso de mineralización, las anexinas II y VI pueden regular a la actina cortical del citoesqueleto para la formación de la vesícula<sup>[19]</sup>.

La mineralización en las VB se divide en dos fases: La primera fase de mineralización ocurre bajo un estricto control celular regulado por enzimas, proteínas y los fosfolípidos de la membrana vesicular. Por otra parte, la segunda fase es un proceso esencialmente fisicoquímico debido a que en ella participan macromoléculas extracelulares de carácter no enzimático, resaltando la colágena cuya función es servir como un andamio en el cual los cristales secretados por la célula mineralizante se depositan para continuar con su maduración<sup>[12]</sup>.

---

La primera fase comienza con la atracción del catión calcio en las inmediaciones de la membrana vesicular debido a la carga negativa de los fosfolípidos. Posteriormente las proteínas afines a  $\text{Ca}^{2+}$ , como Anexina V, traslocan el catión al interior de la VB. Consecutivamente, ALP, PPiase y AMPasa actúan sobre ésteres de fosfato para producir un aumento de iones fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). El aumento de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  da como resultado en la deposición inicial de fosfatos de calcio ( $\text{CaPO}_4$ ), precipitados “amorfos” no cristalinos precursores de los cristales de fosfato octacalcico que posteriormente dan lugar a la formación de una hidroxiapatita menos soluble <sup>[20, 21]</sup>.

La segunda fase inicia con la exposición de los cristales preformados de apatita hacia los fluidos extracelulares donde continúa una propagación del mineral recién formado, acumulándose en estructuras esféricas. Después de un corto período, los cristales entran en contacto con las fibras de colágena de la matriz circundante, en este punto, la colágena desempeña un papel importante en la nucleación y orientación de los cristales de apatita recién formados. La interacción entre los cristales esféricos en suspensión y las fibras de colágena es facilitado por proteínas de la matriz, que proporcionan un puente molecular. Estas proteínas puente incluyen proteína de enlace como proteoglicanos y la colágena tipo X. Las colágenas tipo I o II funcionan sinérgicamente con los cristales de apatita recién formados para lograr la mineralización completa de la matriz ósea debido a que los cristales que se generan dentro y en las superficies de fibras de colágeno se alinean con la periodicidad axial típica de 64 nanómetros de las fibras de colágena <sup>[20, 21]</sup>.

Existen otros factores que afectan el proceso de biomineralización como el pH. Las vesículas de biomineralización, poseen en su interior una alta concentración de la enzima anhidrasa carbónica II que funge un papel importante en el control del pH intravesicular mediante la eliminación de protones que se acumulan como un subproducto de la formación de hidroxiapatita. Los protones acumulados pueden impedir la formación de hidroxiapatita al aumentar la solubilidad del mineral recién formado <sup>[22]</sup>.

De igual manera, existe una gran cantidad de proteínas que se encuentran involucradas promoviendo la biomineralización entre las cuales podemos mencionar:

---

La sialoproteína ósea (BSP) es una fosfoproteína altamente glucosilada y sulfatada que posee motivos de ácido poliglutámico y arginina-glicina-aspartato (RGD) con la capacidad de unirse a hidroxiapatita. La expresión del gen BSP, que se induce en osteoblastos recién formados, está regulada positivamente por hormonas y citocinas que promueven la formación de hueso y se regulan negativamente por factores que suprimen la formación de hueso. La importancia de BSP en la biomineralización, se ha observado en estudios donde esta proteína ha sido utilizada en conjunto con andamios de colágena con la finalidad regenerar tejido óseo, observando una mayor velocidad del proceso de regeneración. En estos estudios, se ha concluido que BSP tiene las propiedades biofísicas y químicas de un nucleador, y que su expresión tiempo-espacial coincide con la mineralización de *novo* en hueso y cemento [23-27].

La proteína morfogénica ósea 2 (BMP2) es un miembro de los factores de crecimiento multifuncionales de la super familia de proteínas TGF-beta. La BMP-2 induce la diferenciación de las células mesenquimatosas en precursores de osteoblastos y promueve la maduración de los osteoblastos aumentando los marcadores Cbfa1 / Runx2 y marcadores osteoblásticos. Las BMPs ejercen su efecto a través de receptores de serina / treonina cinasa de tipo I y II que fosforilan la proteína llamada Smads. La activación del receptor BMP tipo I fosforila Smad1 y Smad5 que luego pueden asociarse con Smad4 en un complejo heteromérico. Este complejo luego se transloca al núcleo donde puede activar la transcripción génica. La funcionalización de andamios de colágena con BMP2 promueve la formación de nuevo hueso y puede ser utilizado como tratamiento de ciertos defectos óseos [28-31].

Osterix (Osx) es un factor de transcripción específico de osteoblastos que activa un repertorio de genes durante la diferenciación de preosteoblastos en osteoblastos y osteocitos maduros. Los embriones mutantes de Osx no forman hueso y no expresan genes marcadores específicos de osteoblastos. La inactivación de Osx en ratones después del nacimiento provoca múltiples fenotipos esqueléticos, incluida la falta de formación de hueso nuevo, la ausencia de reabsorción de cartílago mineralizado y defectos en la maduración y función de los osteocitos. Dado que Osx es un importante efector en la formación del esqueleto, los estudios sobre Osx cobraron impulso durante los últimos cinco o siete años e implicaron su importante función en la formación de los órganos dentarios y la regeneración de las fracturas óseas [32-35].

---

La proteína del cemento 1 (CEMP1) es un regulador clave de la cementogénesis. CEMP1 promueve la migración, la proliferación, la diferenciación de las células del ligamento periodontal (PDL), así mismo puede controlar la tasa de deposición ósea, la composición y la morfología de los cristales de hidroxiapatita. Esto debido a que se encuentra involucrada en la expresión de proteínas involucradas en la biomineralización como ALP y BSP. Además, CEMP1 es capaz de activar vías de señalización involucradas en la biomineralización como p-38 y JNK-MAPK. La transfección de CEMP1 en células no osteogénicas tales como fibroblastos gingivales humanos adultos da como resultado la diferenciación de estas células en un fenotipo celular "mineralizante". Otros estudios han demostrado que CEMP1 podría tener un potencial terapéutico para el tratamiento de defectos óseos y la regeneración de otros tejidos mineralizados <sup>[36-39]</sup>.

La proteína de adhesión al cemento radicular (HACD1/CAP) es considerada una isoforma derivada de un splicing alternativo de la proteína hidroxil coenzima A deshidrogenasa 1 (HACD1), proteína relacionada con el metabolismo de ácidos grasos, diferenciándose la una de la otra en los últimos 15 aminoácidos de la secuencia. El gen que codifica a esta proteína se encuentra entre la región 13-14 del brazo corto del cromosoma 10. La proteína HACD1/CAP se encuentra constituida por 140 aminoácidos, posee un peso molecular aproximado de 14920.16 Da, un punto isoeléctrico de 7.78 y se ha localizado recurrentemente en el citoplasma celular. El cuadro 1 muestra la secuencia de la proteína HACD1/CAP, remarcando en letras de color rojo, los 15 aminoácidos que la difieren de HACD1, en color verde las secuencias random coil y en amarillo las estructuras hélice alfa obtenidas a través de un modelo *in silico*. Se ha observado que esta proteína juega un papel en la diferenciación, adhesión y quimiotaxis de células del ligamento periodontal y del hueso alveolar hacia la superficie radicular. Incrementa la actividad enzimática de ALP, así como la expresión de proteínas involucradas en la mineralización. En estudios de dicroísmo circular se ha observado que esta proteína posee un alto porcentaje de estructura aleatoria. En estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM), se ha observado que la proteína se auto ensambla en esferas que a su vez se aglomeran en fibras. Los resultados observados tanto en los estudios de dicroísmo circular así como en SEM muestran un comportamiento recurrente en otras proteínas involucradas en la mineralización <sup>[40-43]</sup>.

En estudios de formación de cristales *in vitro* en un medio libre de células, se ha observado que la proteína es capaz de promover la formación de estructuras esféricas compuestas de cristales de hidroxiapatita que crecen desde un centro de nucleación. En estudios de biomineralización *in vitro* en defectos críticos de calvaria de rata, se ha observado que la proteína promueve la formación de hueso maduro a 4 meses de tratamiento en comparación con grupos control <sup>[40-43]</sup>.

Cuadro 1. Secuencia de la proteína HACD1/CAP.

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

A su vez, existen proteínas que se encargan de regular la biomineralización. A continuación, se nombran algunas de las proteínas involucradas en el proceso de biomineralización:

La osteopontina (OPN) pertenece a una familia de proteínas ácidas cuyos miembros tienen una gran cantidad de aminoácidos con carga negativa, como Asp y Glu. OPN también tiene una gran cantidad de sitios de secuencia consenso para la fosforilación postraduccional de residuos de Ser para formar fosfoserina, proporcionando carga negativa adicional. Los tramos contiguos de alta carga negativa en OPN han sido identificados y denominados el motivo poliAsp (ácido poli-aspartico) y el motivo ASARM (motivo ácido serina y rico en asparato), teniendo esta última secuencia múltiples sitios de fosforilación. Esta carga negativa total de OPN, junto con sus motivos ácidos específicos y el hecho de que OPN es una proteína intrínsecamente desordenada que permite estructuras abiertas y flexibles, permite que OPN se una fuertemente a los átomos de calcio disponibles en las superficies de cristal en varios biominerales. Tal unión de OPN a varios tipos de biominerales a base de calcio, como fosfatos de calcio en los huesos y dientes, oxalato de calcio en cálculos renales, actúa como un inhibidor de la mineralización de regular el crecimiento de los cristales <sup>[44, 45]</sup>.

---

La proteína de la Matriz Gla (MGP) es miembro de una familia de proteínas que contienen Gla dependientes de vitamina K2. La MGP tiene una unión de alta afinidad a los iones de calcio, similar a otras proteínas que contienen Gla. La proteína actúa como un inhibidor de la mineralización vascular y juega un papel en la organización del hueso [46, 47].

- Minerales de origen patológico en el cuerpo humano

Si bien la hidroxiapatita es uno de los minerales de mayor importancia, en el cuerpo humano también podemos encontrar otros minerales como withlokita ( $\text{Ca}_9\text{Mg}(\text{PO}_3\text{OH})(\text{PO}_4)_6$ ) y brushita ( $\text{Ca}(\text{PO}_3\text{OH}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Ambos podemos localizarlos en cálculos dentales. La formación del cálculo comienza con la deposición de precursores del fosfato cálcico, fosfato octa cálcico (OCP) y brushita (DCPD), precursores de otras fases minerales como withlokita (WHT) e hidroxiapatita (HA), minerales menos solubles. Teóricamente, la sobresaturación de la saliva, especialmente en el fluido del biofilm dental, con respecto a las sales de fosfato cálcico es indispensable para la mineralización de la biopelícula dental [48].

En algunas condiciones patológicas, como la litiasis renal, se ha demostrado la presencia de minerales ectópicos. En esta condición patológica, se observa una cristalización de los componentes en la orina. La formación de cálculos es debido a factores como composición urinaria y defectos en la morfoanatomía renal. Los factores de composición urinaria son importantes en la formación de cristales ya que la orina es un líquido metaestable que contiene varias sustancias coexistentes que pueden cristalizar para generar cálculos renales. Estas sustancias están presentes en niveles sobresaturados (el sistema contiene cantidades más altas de soluto que las correspondientes a la solubilidad), lo que significa que la orina está en un estado inestable y un estado estable de la orina se producirá a través de la cristalización del exceso de soluto. La facilidad de cristalización depende del grado de sobresaturación, la presencia de partículas preformadas (los denominados núcleos heterogéneos que actúan como sustancias promotoras) y el nivel de inhibidores de la cristalización, como es el caso de la urimodulina, nefrocalcina, osteopontina y UPTF1. Estas últimas proteínas inhiben la nucleación y / o el crecimiento de los cristales [49-53].

---

Los cálculos renales poseen un alto contenido de oxalato de calcio dihidratado. La presencia de este mineral se asocia con hipercalciuria, lesión renal y en algunos casos con valores de pH urinario mayor de 6.0. Otros factores que promueven la formación de oxalato de calcio son el alto consumo de sodio, proteína de origen animal, un exceso de vitamina D en la dieta debido a que aumentan las concentraciones de calcio en sangre provocando hipercalciuria <sup>[49, 54, 55]</sup>.

Algunas investigaciones enfocadas en el diseño de fármacos, para combatir la litiasis renal, están basados en moléculas como el ácido benzoico, glicina, ácido hipúrico o ácido fítico, debido a su carga negativa y/o bien que puedan interactuar con cationes para disminuir su concentración. Otras investigaciones estudian las propiedades de proteínas como la uromodulina, una glicoproteína producida exclusivamente en el riñón, debido a que varios estudios *in vitro*, así como investigaciones *in vivo*, específicamente en modelo de nefrolitiasis en rata, demostraron que esta proteína reduce la agregación de cristales de calcio, por ende, inhibe la formación de cálculos renales. Por otra parte, algunos investigadores han optado por estudiar el efecto de péptidos fosforilados derivados de osteopontina sobre la formación, crecimiento y aglomeración de cristales de oxalato de calcio dihidratado, observando una disminución de estos cristales <sup>[50-52]</sup>.



---

- Péptidos en la biomineralización

Los péptidos son polímeros compuestos por aminoácidos en secuencias cortas, que a diferencia de las proteínas, pueden no poseer estructura tridimensional. Cumplen funciones como estimular, regular o inhibir numerosas funciones biológicas; actúan como transmisores de información y coordinar distintas actividades en diferentes tejidos. Estas moléculas se han encontrado presentes en células o en fluidos del cuerpo en cantidades pequeñas, por lo cual, se consideran como posibles agentes terapéuticos. Pueden sintetizarse químicamente a grandes cantidades, y el costo es mucho menor al compararlos con proteínas. Los péptidos han estado a la vanguardia de la investigación científica de las últimas décadas. Su diversidad estructural y alto nivel de selectividad, los posicionan como principales candidatos para desarrollo terapéutico. Para este fin, es deseable ser capaz de sintetizar péptidos bajo condiciones de laboratorio controladas utilizando reacciones químicas altamente eficientes <sup>[56-58]</sup>.

A través de diferentes estudios en el campo de la biomineralización, se ha logrado identificar algunos factores que deben cumplir los péptidos para participar en este proceso entre los cuales podemos destacar:

Composición y secuencia de aminoácidos. La estructura primaria se refiere a la secuencia de aminoácidos que compone los péptidos. Esta estructura puede ser modificada y sutiles sustituciones en la composición de aminoácidos del péptido pueden tener diferentes efectos. Cada residuo dentro de la secuencia peptídica tiene un papel que desempeñar. La histidina y la cisteína son residuos comúnmente asociados con la unión y la quelación, mientras que la tirosina se sabe que induce la reducción de los iones metálicos en su estado de valencia cero. Los residuos ácidos y básicos son responsables de la carga global del péptido y los aminoácidos hidrófobos están implicados en la conformación del péptido, especialmente en un entorno acuoso. La mayoría de las propiedades de los péptidos de unión a metales que son críticos para regular la biomineralización son consecuencia del sinergismo que existe entre los diferentes aminoácidos.

---

De las propiedades de los aminoácidos relacionadas a la mineralización, podemos mencionar: la afinidad de unión con el cristal, la conformación adecuada durante la adsorción sobre la cara de crecimiento cristalino y la carga neta que tienen un efecto sobre la cinética y la termodinámica de la biomineralización <sup>[59]</sup>.

Conformación. El disolvente o las características del medio en el cual se encuentre disuelto el péptido, ejerce efecto sobre las características físicoquímicas de los aminoácidos contribuyendo en la conformación que adopte el péptido. Además, la secuencia de aminoácidos, además de conferir las propiedades generales del péptido, también determina la conformación tridimensional que este adopte. Así pues, mínimas modificaciones en la estructura primaria del péptido afectan la conformación espacial y esto repercute directamente en la fase mineral obtenida o en la eficiencia de mineralización. Algunos estudios indican que péptidos forzados a ciclarse, a través de modificaciones en sus extremos amino y carboxilo terminal agregando cisteínas para formar puentes disulfuro, que dan como resultado modificaciones de la fase mineral obtenida, así como un aumento en la eficiencia de mineralización comparado con su contraparte no modificada que posee una estructura lineal. Otras investigaciones muestran una mejor mineralización en péptidos donde se agrega glicina para distanciar aminoácidos de misma carga, disminuyendo la repulsión electrostática en esas aéreas y aumentando flexibilidad general del péptido provocando una mejor interacción con la superficie del cristal en contraste con la estructura rígida del péptido sin modificación. Así mismo, también se ha observado que la longitud del péptido puede afectar el tamaño de los cristales obtenidos, cadenas largas de aminoácidos pueden promover cristales de mayor tamaño <sup>[59-61]</sup>.

Modificación postraducciona. La modificación postraducciona se refiere a la modificación química de péptidos y proteínas después de la síntesis. La modificación postraducciona es importante porque el tipo de modificación química determina el papel de la proteína sintetizada. Por ejemplo, la incorporación de ubiquitina a una proteína puede indicar que la proteína etiquetada sufrirá degradación. Se han explorado varios estudios que incorporan modificaciones postraduccionales en péptidos. Algunos investigadores han estudiado el efecto de la fosforilación de la serina en la actividad de biomineralización de un péptido de unión a apatita <sup>[62]</sup>.

---

La fosforilación de proteínas desempeña un papel importante en los mecanismos reguladores celulares y también se considera un segundo mensajero importante en la transducción de señales. La fosforilación de un péptido constituido por doce residuos condujo a una mejora de la capacidad de adsorción sobre cara de crecimiento cristalino [62].

Utilizando modelaje molecular, se reveló que la potenciación de la adsorción es provocada por la fosforilación de la serina en la que el grupo fosfato ancla el péptido a la superficie de la apatita. Su contraparte no fosforilada utiliza varios aminoácidos para unirse a la superficie, lo que da como resultado una unión más débil. Además, los péptidos de biomineralización fosforilados inhibieron la osteogénesis *in vitro* ya que los péptidos son capaces de secuestrar inmediatamente los iones de calcio que se necesitan para la formación de hueso [59, 62].

---

## Planteamiento del problema

La biomineralización es un proceso de alta relevancia. A través de ella se genera de manera natural hueso, esmalte, dentina y cemento radicular necesario para dar soporte y ayudar en la locomoción de musculo, así como protección de órganos blandos y facilita la nutrición de vertebrados. Debido a esto, es importante que frente a un traumatismo o enfermedad que comprometa la estructura y desarrollo del tejido óseo, se diseñen tratamientos para acelerar el proceso de regeneración. Sin embargo, la biomineralización también se ve implicada en el desarrollo de cálculos en órganos de difícil acceso quirúrgico que podrían disminuir la calidad de vida de un paciente. De igual manera, es necesario el desarrollo de tratamientos que limiten el desarrollo de estos cálculos. Para ambos casos, el uso *in vitro* de proteínas y péptidos han mostrado mayores ventajas a comparación de otros tipos de medicamentos.

El uso de proteínas de manera terapéutica no es del todo viable debido a que su producción es costosa al igual que su purificación, además, debido a su tamaño es muy probable que el sistema inmune lo reconozca como antígeno y lo elimine. Por lo cual, la investigación se ha centrado en el estudio de compuestos peptídicos miméticos o a la identificación de dominios funcionales debido a que estos otorgan ventajas como: menor costo de producción, síntesis a gran escala, poseen diversidad estructural y un alto nivel de selectividad, así mismo, debido a su reducido tamaño la probabilidad de ser reconocida como un antígeno es menor.

HACD1/CAP es una proteína que participa en el proceso de biomineralización, el mecanismo exacto a través del cual lo regula no está completamente claro, sin embargo, se sabe que la estructura supramolecular en nanoesferas puede promover la deposición de fosfato de calcio mediante la suma de cargas en la superficie hidrófoba y por lo tanto actuar como inhibidor o como nucleador de la biomineralización.

En este trabajo, empleamos un péptido derivado de la proteína HACD1/CAP que podría ser un motivo funcional con la capacidad de interactuar con cristales de calcio. Los nuevos conocimientos obtenidos a partir de este estudio permitirán entender los mecanismos moleculares mediante los cuales la proteína puede llevar a cabo sus funciones, permitiendo generar novedosas alternativas en la ingeniería de tejidos mineralizados.

---

## **Hipótesis**

El péptido MASSDEDGTNGGAS derivado de la proteína HACD1/CAP modula la formación y crecimiento de cristales de hidroxapatita y/u oxalato de calcio durante el proceso de biomineralización.

## **Objetivo**

Determinar el efecto del péptido derivado de HACD1/CAP en la formación y crecimiento de minerales de importancia biológica, así como su posible papel en el proceso de biomineralización *in vitro*.

## **Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto del péptido derivado de HACD1/CAP sobre la formación y crecimiento cristalino de hidroxapatita.
2. Evaluar el efecto del péptido derivado de HACD1/CAP sobre la formación y crecimiento cristalino de oxalato de calcio.
3. Determinar el papel biológico del péptido derivado de HACD1/CAP sobre el proceso de biomineralización *in vitro*.

---

## Metodología

- Selección y síntesis del péptido

La secuencia sintetizada fue MASSDEDGTNGGAS, correspondiente a los aminoácidos 40-54 de la proteína HACD1/CAP. La selección de este péptido se basó en la secuencia de aminoácidos, así como propiedades fisicoquímicas como hidrofobicidad empleando tres programas diferentes: HMMTOP, TMHMM, TMpred donde se obtuvieron secuencias consenso relacionadas con el proceso de biomineralización. Se solicitó la producción del péptido a Invitrogen, Carlsbad, USA que realizó la síntesis por el método de fase sólida, en este proceso se utiliza FMOC/tBu como protectores de los grupos amino y carboxilo de los aminoácidos, de esta manera se realiza una síntesis ordenada y selectiva del péptido.

- Caracterización fisicoquímica del péptido

Se determinó el punto isoeléctrico (pI) del péptido de manera virtual mediante el método de Gauci y cols. Este instrumento calcula el pI de un péptido a un pH particular usando valores de pKa especificados por el usuario. El cálculo se repite hasta que el pH correspondiente a una carga neta de cero. El valor de pI se calculará utilizando las opciones Scansite y ExPasy. A través de dispersión dinámica de luz, se determinó el tamaño de partícula del péptido empleando el equipo Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Ltd., UK) con laser semiconductor de 4 mW, 633 nm. Se evaluó el tamaño de partícula del péptido a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en buffer HEPES (10mM) en un volumen final de 400  $\mu\text{L}$  a 37 °C y pH 7.4.

---

- Autoensamble del péptido

Para determinar el posible autoensamblaje del péptido, se empleó microscopía de fuerza atómica (MFA). Mediante el empleo de una mica, con la cual simula las interacciones del péptido con un cristal, se obtuvo la topografía del péptido mediante la atracción/repulsión de un cantiléver. Para ello, se emplearon concentraciones de 0.5, 1.0 y 15.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  del péptido colocando una gota ( $\sim 30 \mu\text{L}$ ) en la mica y se dejó secar durante 5min, posteriormente se obtuvo la imagen mediante microscopía de fuerza atómica (MFA) (Jeol, JSM-S900LV Scanning Probe Microscope), se analizaron y visualizaron en 3D mediante el programa WSxM 4.0 Beta 8.2.

- Ensayos de cristalización de hidroxiapatita

Para observar el efecto del péptido sobre la cristalización de novo se utilizaron soluciones de:  $\text{Ca}^{2+}$  50 mM,  $\text{PO}_4^{3-}$  50mM y buffer HEPES 50 mM (pH 7.4) y agua destilada/filtrada. Se utilizaron concentraciones de 0.5-25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  del péptido. Posterior a la incubación de las soluciones con el péptido, se realizó tinción con Alizarina Roja S (0.5%, pH 4.2) para medir la absorbancia de los precipitados a 570 nm. Los datos fueron normalizados contra un grupo sin péptido (control).

- Ensayos de crecimiento cristalino por composición constante

Tomando en cuenta las concentraciones evaluadas en los ensayos de cristalización en hidroxiapatita, se realizaron ensayos de crecimiento cristalino por composición constante para evaluar el efecto del péptido sobre cristales de hidroxiapatita empleando 2 mg de semillas de HA, soluciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{NaCl}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y diferentes concentraciones del péptido en agitación constante a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . El cambio de pH debido al crecimiento de hidroxiapatita fue medido con el electrodo pH4006 conectado a una maquina de titulación TIM856 que suministra volúmenes de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{NaCl}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  para mantener un pH constante de 7.4. La duración del ensayo es de 4 hrs. Las concentraciones de péptido evaluadas fueron 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y se realizaron ensayos sin péptido, como control.

- 
- Adsorción en cristales de hidroxiapatita

Para determinar la interacción física de péptido sobre hidroxiapatita, se realizó el marcaje del péptido con 5  $\mu\text{L}$  de AlexaFluor-488 (carboxylic acid) en dimetilformamida en 200  $\mu\text{L}$  de buffer PBS (2.5 mg/mL) y carbonato de sodio 1 M a pH 8.3, se incubó 1 hr a temperatura ambiente, el péptido no marcado se removió mediante diálisis en buffer de TBS pH 7.4. Una vez marcado, se empleó de 1 a 20  $\mu\text{g}$  del péptido cultivado en 800  $\mu\text{g}$  de cristales de hidroxiapatita, se incubó a 37°C por 30 min. Después de la incubación se centrifugaron las muestras y se realizaron dos lavados con buffer TBS.

El botón obtenido se resuspendió en buffer de TBS con EDTA y se midió la fluorescencia mediante espectrofotometría tanto de los lavados como de la suspensión final para calcular la cantidad de péptido adherido. Posteriormente, utilizando el microscopio confocal Olympus FV1000, se realizó una cinética de adsorción del péptido marcado sobre semillas de hidroxiapatita, adquiriendo imagen cada 5 minutos durante 30 minutos.

- Ensayos de cristalización de oxalato de calcio

Para observar el efecto del péptido sobre la cristalización de *novo* se utilizaron soluciones de:  $\text{Ca}^{2+}$  5 mM,  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  5mM y agua desionizada/destilada/filtrada. Se utilizaron concentraciones de 0.5-25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  del péptido. Posterior a la incubación de las soluciones y el péptido, se realizó tinción con Alizarina Roja S (0.5%, pH 4.2) para medir la absorbancia de los precipitados a 570 nm. Los datos fueron normalizados contra un grupo sin péptido.

- Adsorción en cristales de oxalato de calcio

Para determinar el comportamiento del péptido sobre los cristales de oxalato de calcio, se agregó 20  $\mu\text{L}$  del péptido marcado con AlexaFluor-488 a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sobre cristales recién sintetizados de oxalato de calcio. Utilizando el microscopio confocal Olympus FV1000, se realizó una cinética de adsorción adquiriendo imagen cada 5 minutos durante 45 minutos.



- 
- Ensayos de microscopía electrónica de barrido

Se evaluó el efecto del péptido sobre la superficie del cristal a través de microscopía electrónica de barrido utilizando el microscopio JSM-7800F Schottky Field Emission Scanning Electron con diferentes concentraciones del péptido (0.5 y 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en cristales de oxalato de calcio formados de *novo* bajo las condiciones previamente descritas.

- Efecto de péptido sobre osteoblastos humanos

Se cultivaron osteoblastos humanos a una densidad de  $3 \times 10^3$  de células en cajas de 96 pozos entre el segundo y tercer pasaje incubándose durante 24 hrs. para permitir su adhesión. Posteriormente, un grupo control fue cultivado con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), otro grupo control fue cultivado con medio DMEM suplementado 2% de SFB así como los cultivos experimentales a los cuales se les adicionó con 0.1, 0.5 y 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del péptido de HACD1/CAP. Mediante el ensayo con MTT (5 mg/mL) se determinó el papel del péptido sobre la proliferación de los osteoblastos a 1, 3 y 5 días de tratamiento. En cada día de ensayo, se agregó 10  $\mu\text{L}$  de MTT dejándolo incubar por 3 horas, al terminar se retiró el medio de cultivo y se añadió 100  $\mu\text{L}$  de DMSO, dejándose incubar por 15 min. Se obtuvo la lectura de la absorbancia a 570 nm.

- Efecto del péptido sobre la deposición de nódulos de calcio

Se sembraron osteoblastos a una densidad de  $3 \times 10^3$  de células en cajas de 6 pozos y se incubaron por 24 hrs. A los cultivos se les adicionó “medio mineralizante” (10 mM  $\beta$ -glicerofosfato y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ácido ascórbico); al cultivo experimental se agregó 0.1, 0.5 y 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del péptido y se incubaron por 3, 7 y 14 días. En cada término correspondiente las células se fijaron en alcohol al 96% durante 10 minutos y la deposición de los nódulos de calcio se identificó utilizando una solución de Alizarina Roja S a pH 4.2 durante 5 minutos. El exceso de colorante se eliminó lavando con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, dejando secar los pozos para tomar fotografías del campo a 40X o agregando 200  $\mu\text{L}$  de DMSO para obtener la monocapa de células en conjunto con los nódulos de calcio teñidos con Alizarina Roja S y realizar su cuantificación a 570 nm.

- 
- Actividad específica de fosfatasa alcalina

Se sembraron osteoblastos entre el segundo y tercer pase, a una densidad de  $2 \times 10^4$  de células en cajas de 24 pozos. Se formaron tres grupos: un grupo control: cultivado con medio mineralizante; control positivo, donde hay una mayor inhibición de la actividad enzimática: complementado con pirofosfato; y grupos experimentales: adicionados con 0.5 µg/ml y 1.0 µg/ml del péptido. Todos los grupos fueron cultivados durante 3, 7 y 14 días.

Al término de cada tiempo, se retiró el medio y se extrajeron las monocapas celulares adicionando 250 µl de 10 mM Tris-HCL pH 7.4 conteniendo 0.1% de Tritón X-100, se sonicaron para lisar las células, se centrifugaron a 14,000 rpm por 4 min conservando el sobrenadante. La concentración de proteína se determinó utilizando albúmina sérica bovina como control y de acuerdo al método de Bradford. Se determinó la actividad específica de la fosfatasa alcalina (ALP) de acuerdo al método de Lowry utilizando P-nitrofenil fosfato (PNP) como sustrato para la enzima. La actividad específica se expresa como microgramos de p-nitrofenol por minuto por miligramo de proteína.

- Expresión génica a nivel transcripcional

Para determinar el comportamiento del péptido sobre la expresión de proteínas involucradas en el proceso de biomineralización (BSP, BMP, CEMP1, HACD1/CAP, OSX) utilizándose a GAPDH como control de carga. Se realizaron cultivos de osteoblastos con diferentes condiciones: medio mineralizante (grupo control), pirofosfato (control positivo), péptido a 0.5 µg/mL y 1.0 µg/mL (experimentales) durante 3, 7 y 14 días. Transcurrido el tiempo experimental, se retiró el medio de cultivo y se agregó 250 µL de PBS estéril frío a cada pozo. Se raspó la base del pozo donde se encontraba la monocapa celular con el raspador de células (cell scraper) bajo condiciones de baño con hielo. Se pasó el contenido celular a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se centrifugó a 5,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla en buffer de lisis, se sonicó la muestra, manteniéndolas en baño con hielo, 30 pulsos X 5 segundos. Se centrifugó a 5,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se pasó el sobrenadante a un tubo limpio y se realizó la cuantificación de proteínas por método de Bradford. Posteriormente se realizó electroforesis SDS-PAGE en geles de Acrilamida/Bis-Acrilamida al 12% donde se cargaron 30 µg de proteínas por pozo en cada corrida, llevándose a cabo a 20 mV por

---

cada gel. Posteriormente se realizó Western Blot transfiriéndose las proteínas en gel a membranas de PVDF (Polifluoruro de vinilideno).

Posteriormente se incubaron las membranas cargadas con anticuerpos monoclonales contra las proteínas específicas de interés en relación de 1:500. Consecutivamente se agregó el anticuerpo secundario (1:500) contra el origen del anticuerpo primario y se reveló con DAB (Diaminobencidina). Por último, las membranas fueron digitalizadas y trabajadas con el programa GIMP.

- Análisis estadístico

Los resultados se reportan como el promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar de la media. Para determinar una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los resultados se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de una prueba de Tukey realizando comparaciones múltiples entre los grupos. Se utilizó el paquete estadístico SPSS® (versión 22 win64) y un valor de  $p < 0.05$  indicó diferencia significativa.

---

## Resultados

- Caracterización fisicoquímica del péptido

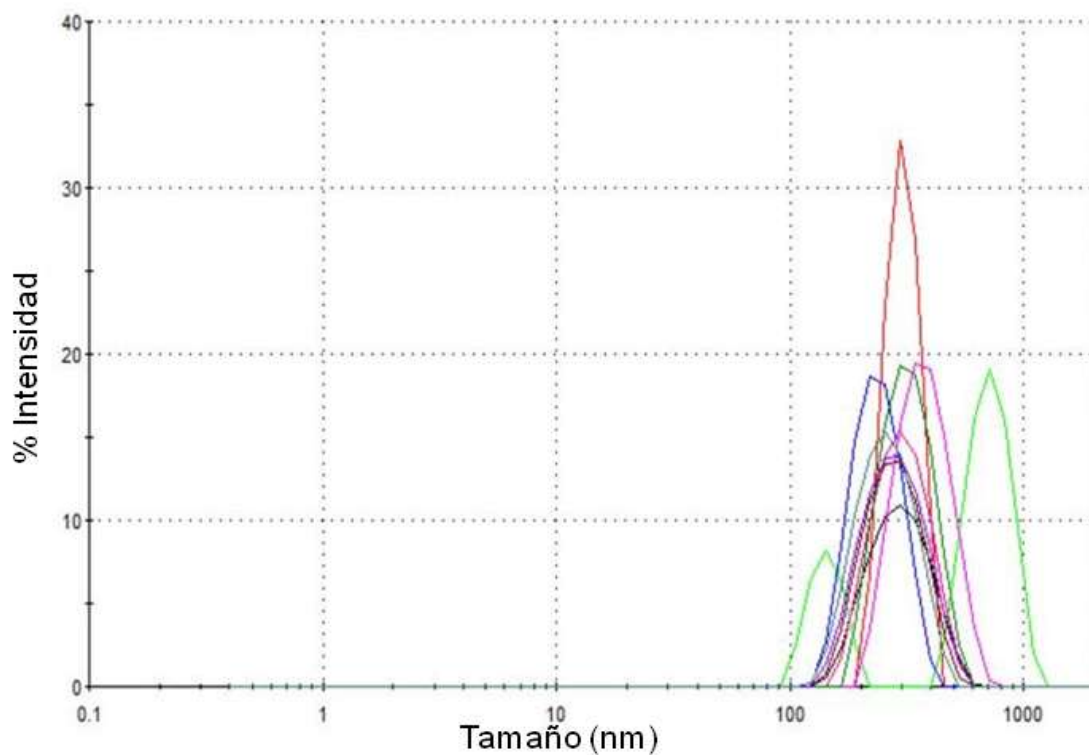
Las características fisicoquímicas del péptido seleccionado fueron calculadas de manera virtual a través de ExPasy y se describen en el cuadro 2:

Cuadro 2. Características del péptido.

Péptido	
Secuencia	MASSDEDGTNGGASE
Numero de aminoácidos	15
Peso Molecular (Da)	1427.37
pI Teórico	3.43
Residuos con carga negativa	4

Como se puede observar en el Cuadro 2, la longitud del péptido consta de 15 residuos de aminoácidos lo cual supone una ventaja frente a proteínas debido a la reducida o nula probabilidad de desencadenar una respuesta inmune. Así mismo, el punto isoeléctrico es de 3.43 lo cual nos indica que a pH fisiológico (pH= 7.2) los grupos desprotonables de los residuos de aminoácidos que componen al péptido tendrán una carga negativa, lo cual le permiten interactuar con cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$  o cargas positivas en estructuras cristalinas.

Mediante dispersión dinámica de luz se determinó el comportamiento del péptido en solución. En la gráfica 1 podemos observar que el péptido presenta tamaños de partícula en un intervalo de 100 a 1000 nm, siendo partículas de 500 nm las de mayor abundancia. Debido a la gran disparidad de datos, se puede sugerir que el péptido bajo estas condiciones se encuentra estableciendo agregados de diferente tamaño.



Gráfica 1. Diagrama de dispersión dinámica de luz realizada a 37 °C y pH fisiológico.

El cuadro 3, resume los parámetros analizados para el estudio de microscopia de fuerza atómica con diferentes concentraciones del péptido seleccionado, montado sobre micas.

Cuadro 3. Análisis de microscopia de fuerza atómica a diferentes concentraciones del péptido.

Parámetro	Concentración de péptido ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )		
	0.5	1.0	15.0
Diámetro promedio (nm)	23.70	164.35	547.26
Rugosidad promedio	0.8098	11.902	36.0733
Altura media (nm)	4.79	25.23	90.61
Asimetría de la superficie	-0.018	0.2513	0.7135
Curtosis superficial	3.6942	2.1335	2.9527
Superficie aplanada ( $\mu\text{m}^2$ )	1.9016	7.4267	8.2693

---

Referente a los parámetros analizados: la rugosidad promedio es la media de la diferencia, en valor absoluto, entre la altura promedio y la altura de cada punto individual de la muestra. Este número varía con el intervalo de intervalo. Muestra qué tan áspera es la muestra. La asimetría de la superficie es una medida de la dirección de la asimetría de la distribución de alturas en la muestra. El valor numérico nos da información sobre la dirección de la asimetría de la distribución de alturas: si el valor obtenido es  $> 0$ : asimetría positiva; si el valor obtenido es  $= 0$ : distribución simétrica; si el valor obtenido es  $< 0$ : asimetría negativa. La curtosis superficial es una medida del pico de la distribución de alturas en la muestra al compararla con la distribución Normal. El valor numérico de nos da información sobre la distribución de alturas: si el valor obtenido es  $> 3$ : distribución leptocurtica; si el valor obtenido es  $= 3$ : distribución mesocúrtica; si el valor obtenido es  $< 3$ : distribución platicurtica. La superficie alisada es una estimación del área real de la muestra tomando en cuenta el área de las estructuras 3D <sup>[63, 64]</sup>.

En el cuadro 3 se puede observar que conforme aumenta la concentración del péptido también aumentan los valores de diámetro promedio, rugosidad promedio, altura promedio y superficie aplanada. Esto nos indica un aumento de las estructuras tridimensionales conforme aumenta la concentración de péptido. En la Figura 1 se observa que a una concentración de  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , el péptido se autoensambla en estructuras esféricas aisladas con diámetros de  $23.7 \text{ nm}$  y  $4.79 \text{ nm}$  de altura. En relación al cuadro 3, estas esferas poseen una asimetría negativa además de una distribución leptocurtica. Al emplear una concentración de  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 2), se puede observar que el péptido mantiene las estructuras en esferas con tamaño de  $164.35 \text{ nm}$  de diámetro y  $24.23 \text{ nm}$  de altura, ambos valores aumentan en comparación con la concentración de péptido anterior, además, estas esferas pueden encontrarse aisladas o bien formando aglomerados de tamaño cercano a  $500 \text{ nm}$ . Presentan una asimetría positiva y una distribución platicurtica. Al incrementar la concentración del péptido a  $15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 3), se observan aglomerados de un tamaño de partícula mayor a  $550 \text{ nm}$  y altura promedio de  $90.61 \text{ nm}$ . Presenta asimetría positiva y distribución platicurtica. Los tamaños de partícula observados respaldan la información obtenida en dispersión dinámica de luz donde el intervalo indicaba partículas con tamaño desde  $100 \text{ nm}$  a  $1000 \text{ nm}$ . Se puede sugerir que el número, tamaño y forma de las estructuras de autoensamblaje del péptido son dependientes de la concentración.

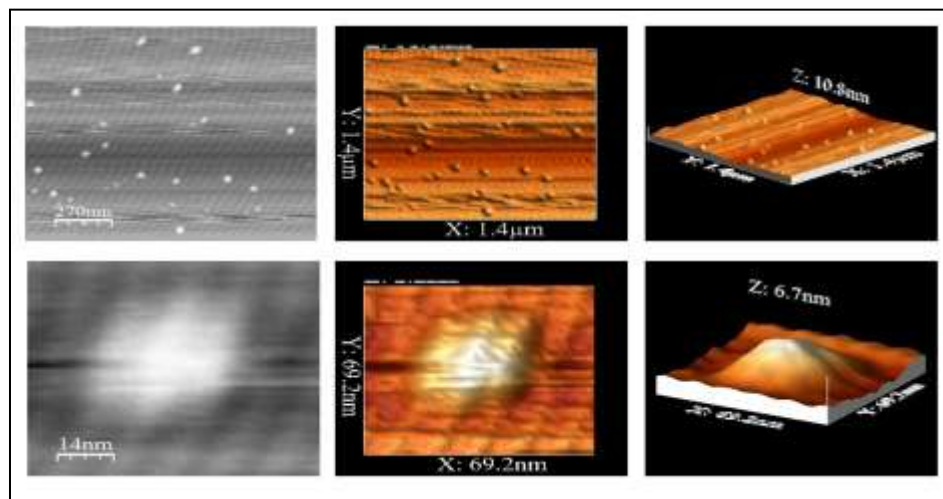


Figura 1. Imágenes de MFA para péptido a concentración de 0.5 µg/µL.

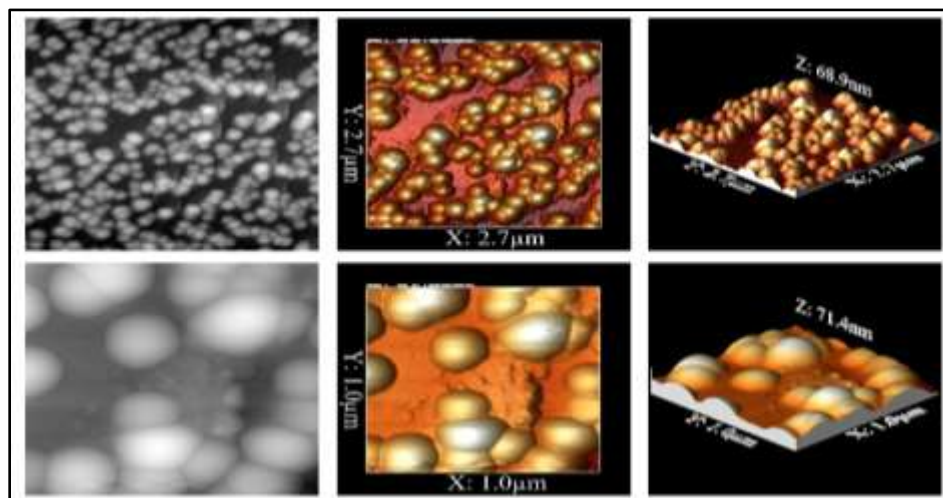


Figura 2. Imágenes de MFA para péptido a concentración de 1 µg/µL.

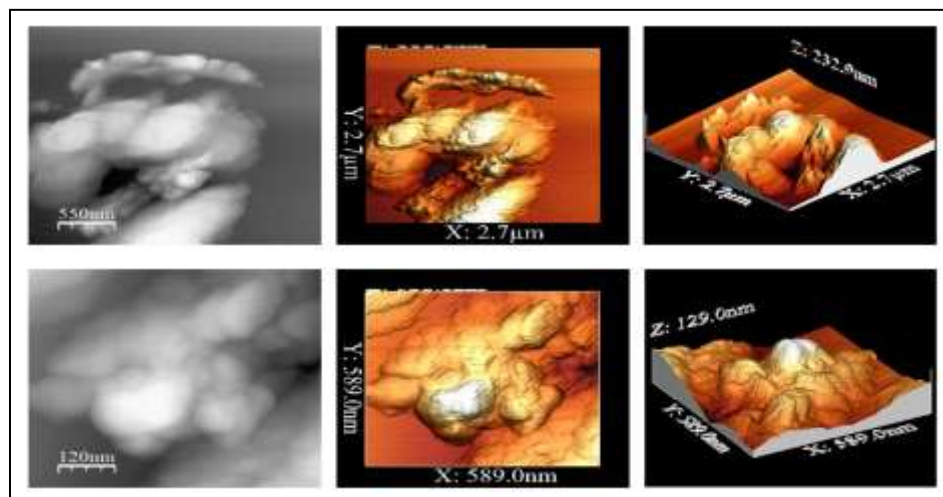
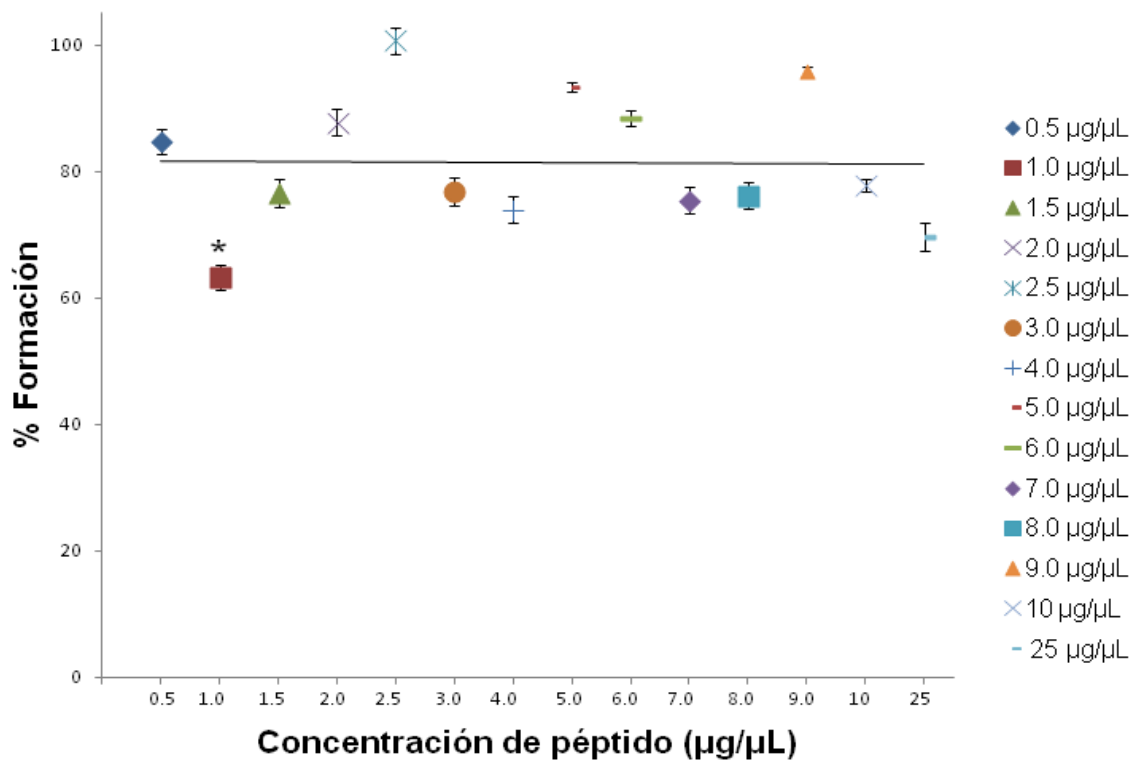


Figura 3. Imágenes de MFA para péptido a concentración de 15 µg/µL.

- Ensayos de cristalización de hidroxiapatita

La gráfica 2 nos muestra el papel del péptido a diferentes concentraciones en la formación *in situ* de cristales de hidroxiapatita (HA). La mayoría de las concentraciones evaluadas muestran un efecto inhibitorio en la formación de HA. Sin embargo, la concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de péptido muestra el mayor porcentaje de inhibición, aproximadamente 40%.

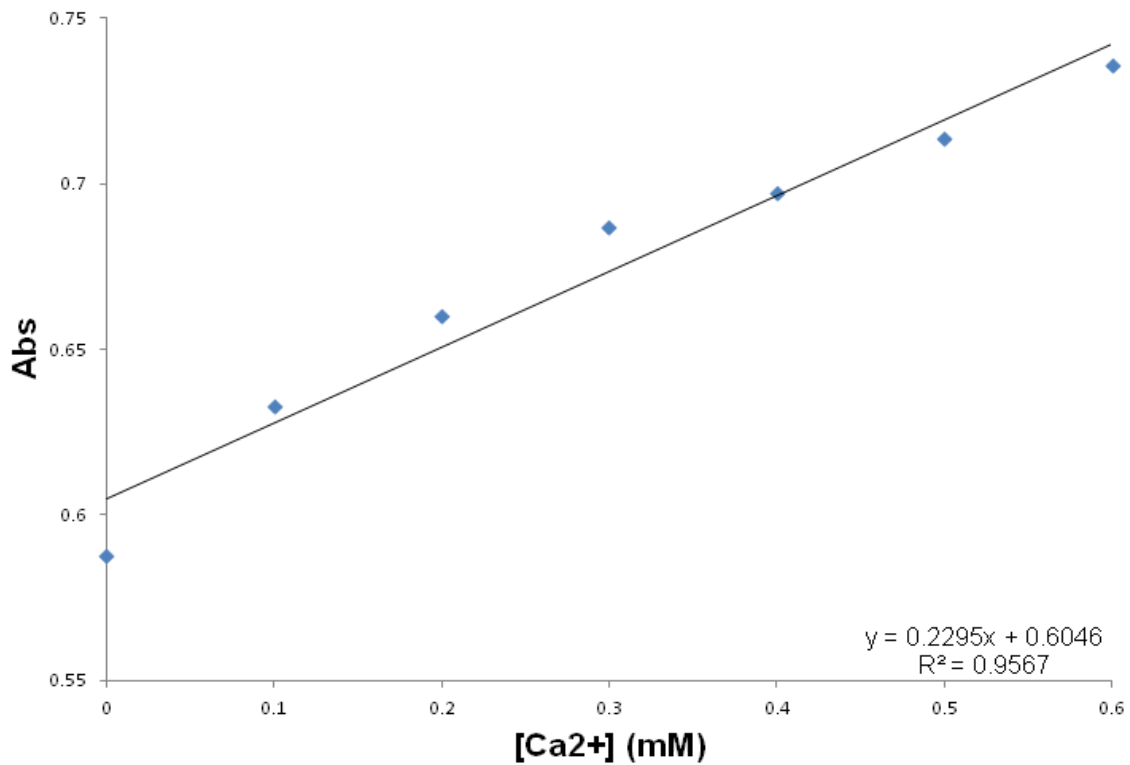


Gráfica 2. Efecto del péptido sobre la formación de cristales de hidroxiapatita. Se gráfica el porcentaje de cristalización mineralizado para cada una de las concentraciones de péptido evaluadas. Se reporta el valor promedio ( $n=3$ )  $\pm$  desviación estándar ( $p<0.05$ ).

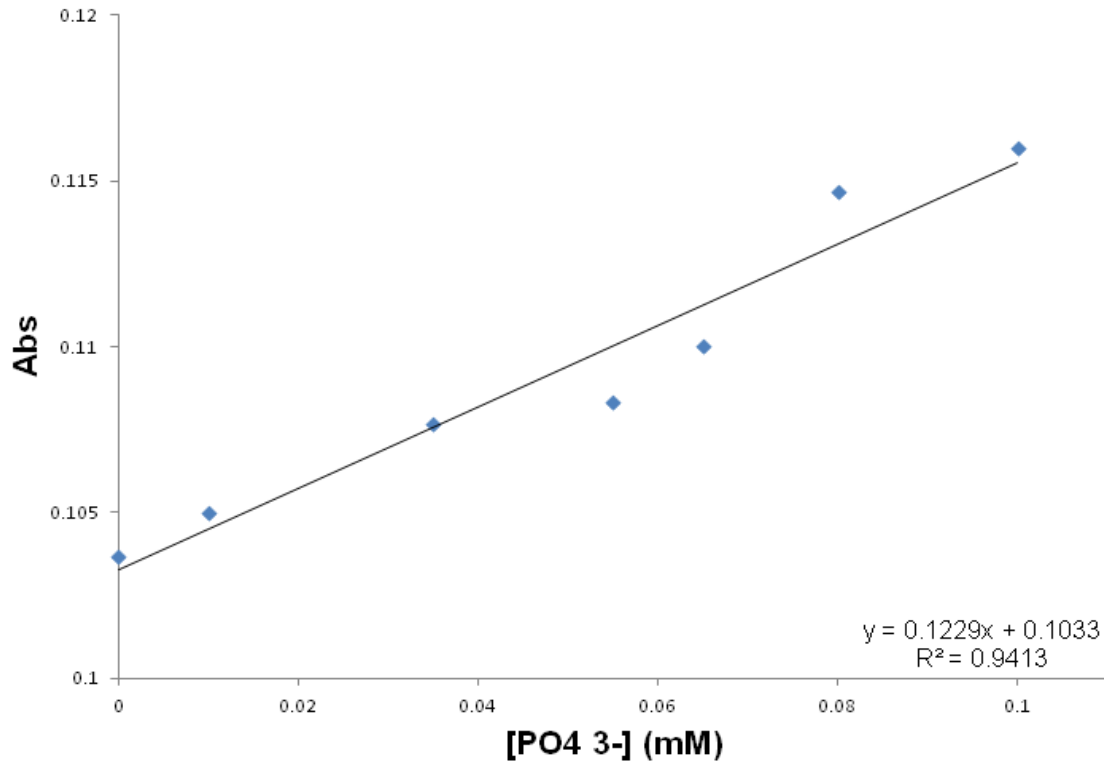


- Ensayos de crecimiento cristalino por composición constante

Para calcular las concentraciones de calcio y fosfatos soluciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  se realizaron curvas patrón empleando los kits colorimétricos comerciales Quant-Chrom™ Calcium Assay Kit, así como ALS PiCollorLock™ Pi Detection Reagent, respectivamente, realizando los ajustes en volumen necesario para llevar a cabo los ensayos de crecimiento cristalino por composición constante.

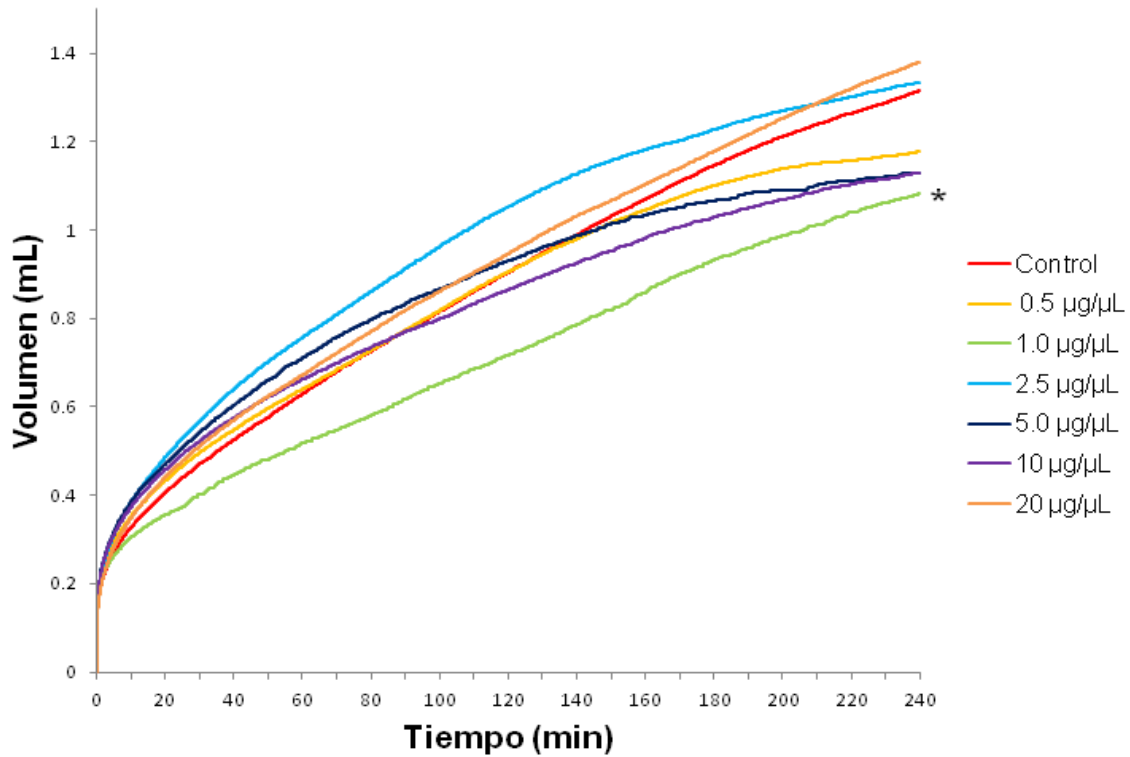


Gráfica 3. Curva patrón de  $\text{Ca}^{2+}$ .



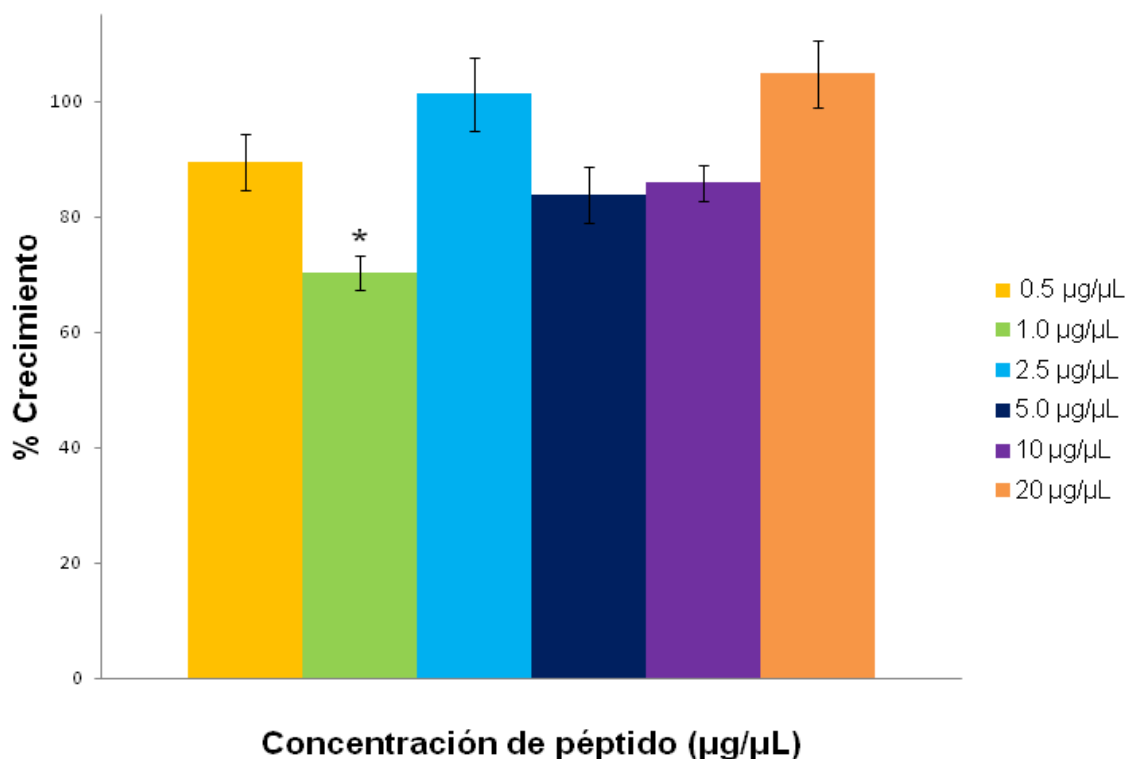
Gráfica 4. Curva patrón de  $\text{PO}_4^{3-}$ .

El titulador TIM856, con el que se realizó el ensayo de crecimiento cristalino por composición contante, registra el volumen de las soluciones de calcio o fosfato agregadas para estabilizar el pH durante las 4 horas del ensayo. Con estos datos es posible construir las curvas representadas en la grafica 5. Cada una de las curvas nos indica el gasto en volumen de reacción para las concentraciones de péptido evaluadas, este parámetro se encuentra relacionado con el crecimiento de hidroxiapatita. Se puede observar que las concentraciones 2.5 y 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  hay un gasto de volumen mayor al control (curva en control rojo), mientras que con 0.5, 1.0, 5.0 y 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  el gasto de volumen final es menor al control. Debido a esto, podemos inferir que el péptido inhibe el crecimiento de cristales de hidroxiapatita.



Gráfica 5. Curvas de crecimiento cristalino por composición constante de hidroxiapatita.

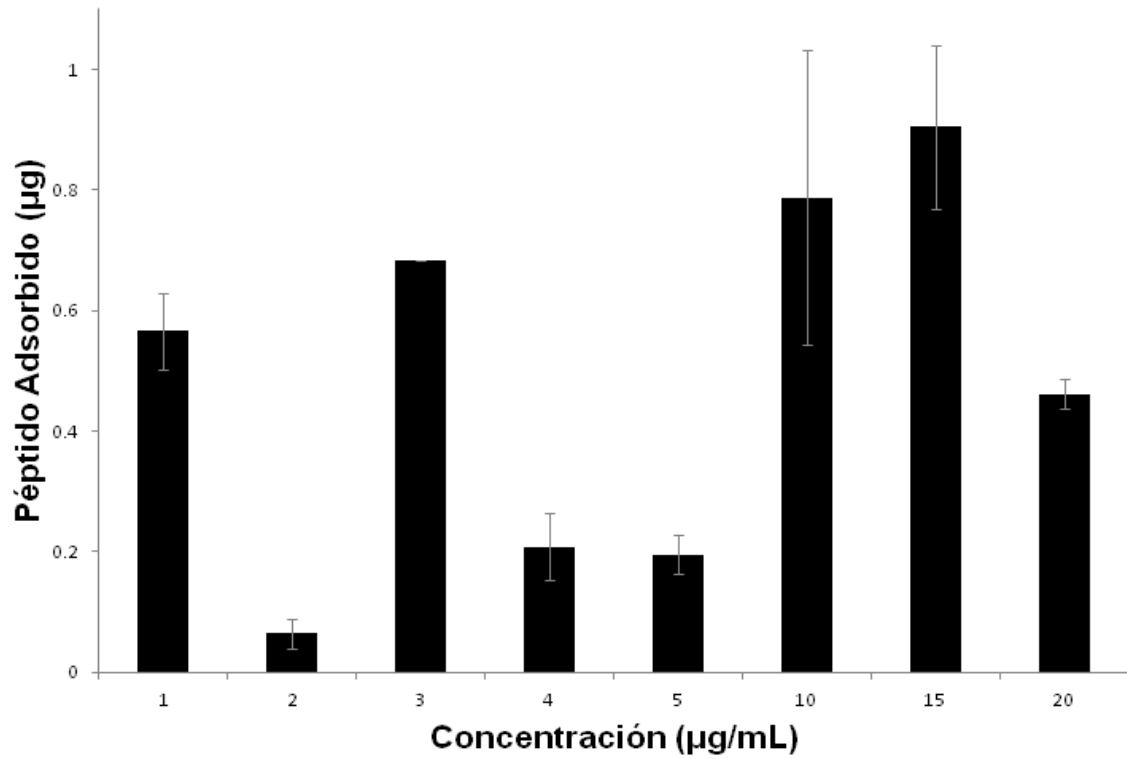
Normalizando los valores de gasto de volumen final de los ensayos realizados con el péptido contra el control (Gráfica 6), se puede observar que la mayoría de las concentraciones del péptido evaluadas tienen un porcentaje de cristalización menor al 100%, lo que sugiere que el péptido posee un comportamiento inhibitorio en la mineralización de hidroxiapatita bajo condiciones de pH y temperaturas fisiológicas. Sin embargo, la concentración 1 µg/µL de péptido posee un mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento de HA, aproximadamente 30% de inhibición.



Gráfica 6. Porcentaje de cristalización de hidroxiapatita a diferentes concentraciones de péptido. Se reporta el valor promedio (n=3) ± desviación estándar (p<0.05).

- Adsorción en cristales de hidroxiapatita

En la Gráfica 7, se gráfica la cantidad en microgramos de péptido adsorbido a cristales de hidroxiapatita en función de la concentración añadida para cada ensayo. Se puede observar que las concentraciones de 1, 3, 10, 15 y 20 µg/mL son las que presentan mayor adsorción con 58.2, 71.8, 76.5 y 88.3 µg respectivamente. Posteriormente, utilizando el microscopio confocal Olympus FV1000, se observó la adsorción del péptido marcado sobre hidroxiapatita preformada agregando 20 µL del péptido a una concentración de 1 µg/mL, se realizó adquisición de imagen cada 5 minutos durante 30 minutos. En la figura 4 se puede observa que el péptido se adsorbe sobre la superficie del cristal y que conforme pasa el tiempo, existe una mayor cantidad de péptido acumulado sobre el mismo. En conjunto, estos resultados demuestran que el péptido es capaz de interaccionar con el cristal de hidroxiapaptita adsorbiéndose preferentemente en su superficie.



Gráfica 7. Adsorción dependiente de la concentración. Se reporta el valor promedio (n=3) ± desviación estándar (p<0.05).

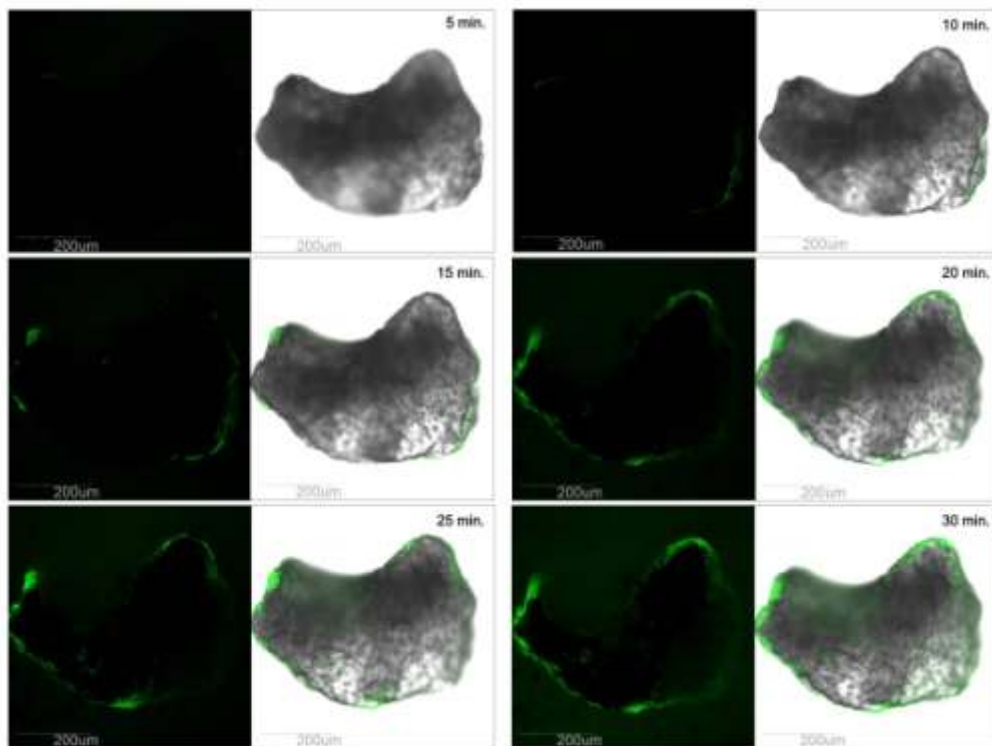
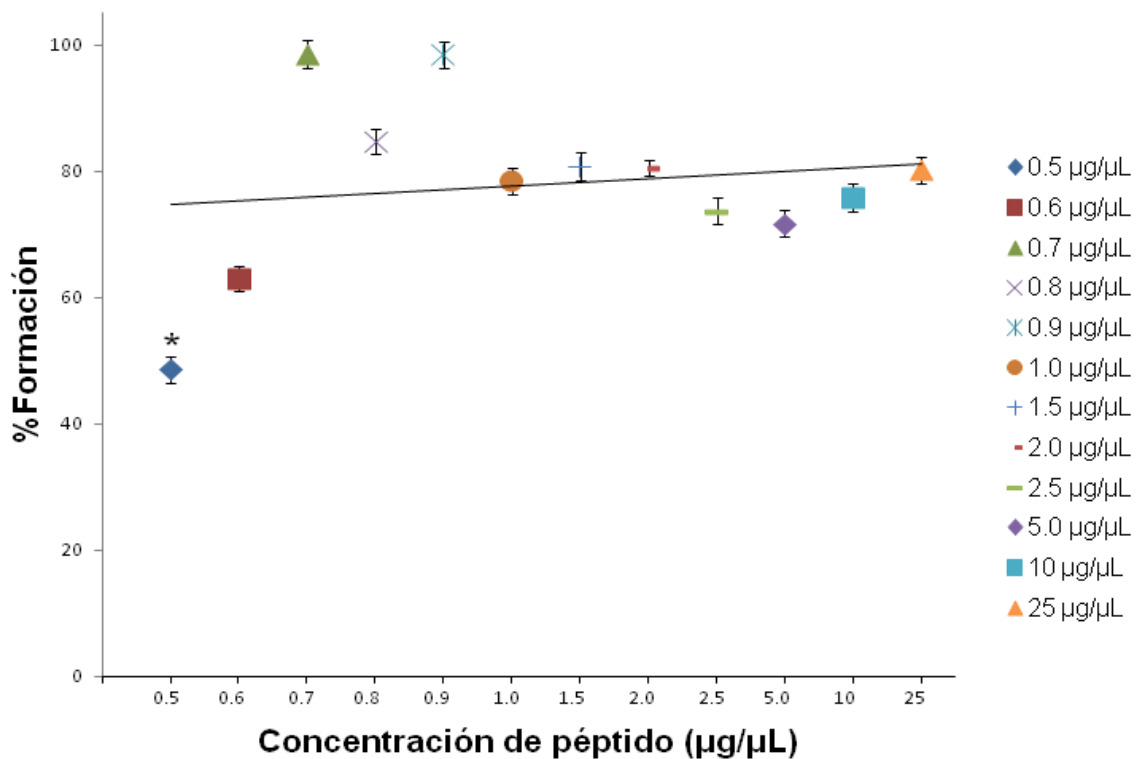


Figura 4. Adsorción de péptido marcado con AlexaFluor488 sobre cristales de Hidroxiapatita

- Ensayos de cristalización de oxalato de calcio

En el caso del ensayo de formación de oxalato de calcio (Gráfica 8), se observa que el péptido tiene una tendencia a la inhibición de este mineral. La concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  mostró mayor porcentaje de inhibición en la formación de cristales de oxalato de calcio, alrededor de 50%. Esto nos sugiere que, en el caso de oxalato de calcio, el péptido presenta naturaleza inhibitoria en el proceso de cristalización *in vitro*.



Gráfica 8. Efecto del péptido sobre la formación de cristales oxalato de calcio. Se gráfica el porcentaje de cristalización mineralizado para cada una de las concentraciones de péptido evaluadas. Se reporta el valor promedio ( $n=3$ )  $\pm$  desviación estándar ( $p<0.05$ ).

- Adsorción en cristales de oxalato de calcio

En la figura 5 se puede observa que el péptido marcado se adsorbe sobre las caras de crecimiento cristalino de oxalato de calcio y se mantiene hasta terminar el ensayo. Se realizaron análisis de las imágenes a través del software ImageJ.

---

En gráfica 9 se muestra la intensidad de fluorescencia en relación con el tiempo, se puede observar que desde el tiempo cero existe una interacción del péptido con los cristales de oxalato de calcio, y que, conforme pasa el tiempo, existe un ligero aumento de la adsorción del péptido sobre las caras de crecimiento cristalino del oxalato de calcio de  $2.1 \times 10^5$  de intensidad a tiempo 0 hasta  $2.74 \times 10^5$  a los 45 min.

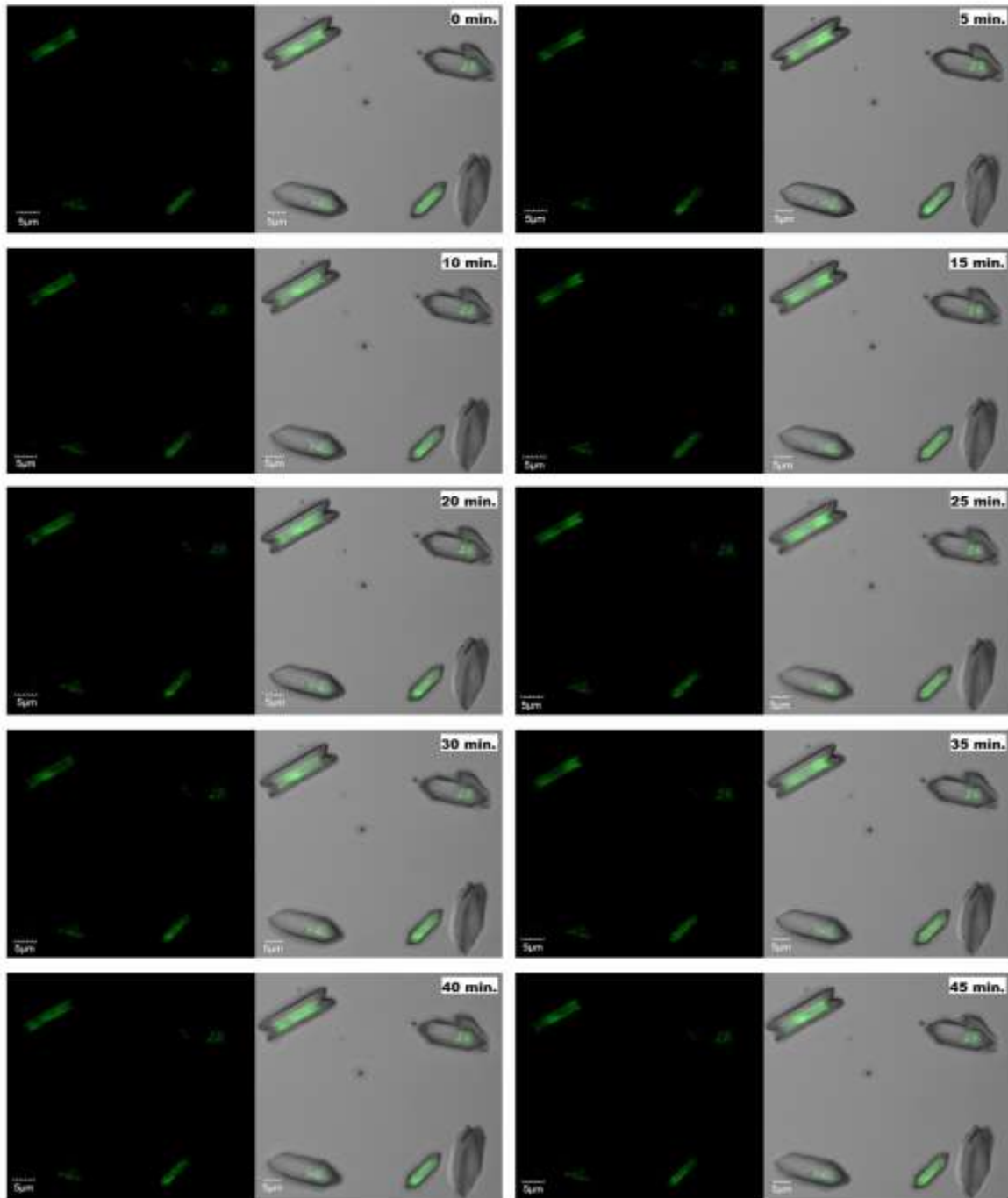
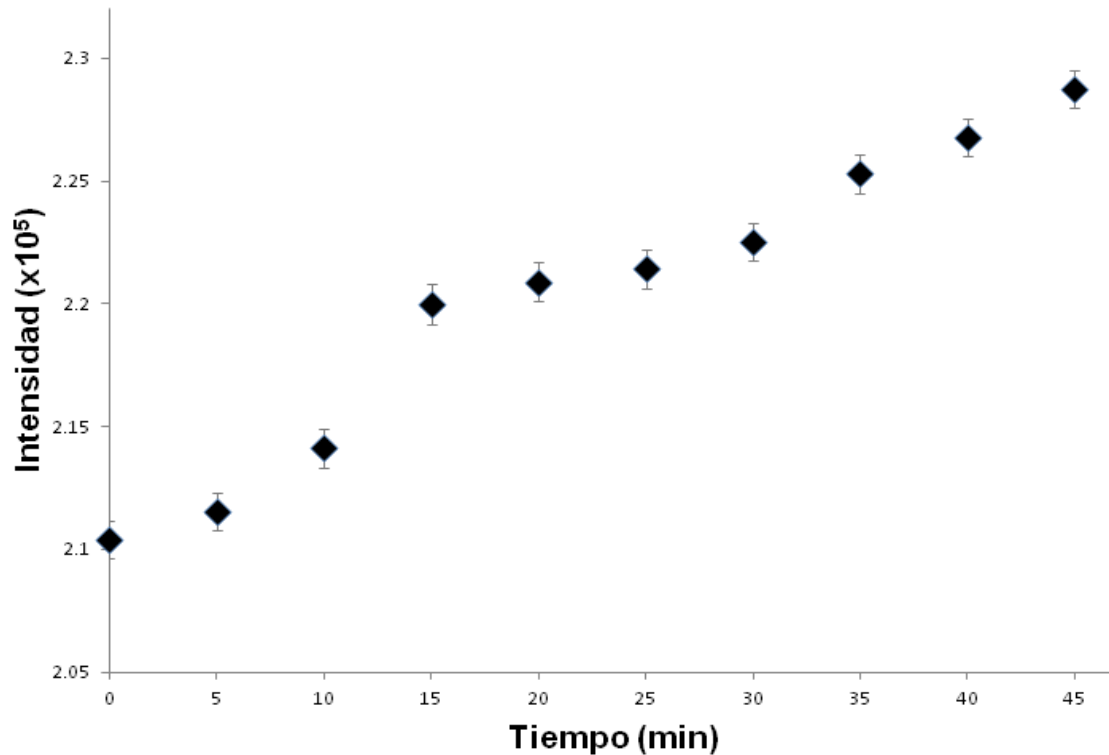


Figura 5. Microscopia confocal de péptido marcado sobre cristales de oxalato de calcio recién sintetizados.



Gráfica 9. Cinética de adsorción de péptido marcado sobre cristales de oxalato de calcio sintetizados a pH neutro y temperatura ambiente. Se reporta el valor promedio  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0.05$ ).

Con relación a estas observaciones, se decidió realizar los ensayos de microscopía electrónica de barrido. En los reportes científicos de Adam Taller<sup>[65]</sup> y Bernd Ghroge<sup>[66]</sup> establecen protocolos de síntesis de oxalato calcio, que fueron utilizados en este proyecto, además estudiaron a profundidad estos cristales; realizando microscopía electrónica de transmisión, los autores lograron determinar las orientaciones cristalinas y a su vez, las relacionaron con la morfología del cristal. Gracias a los protocolos de síntesis, así como los datos del cristal en estos reportes, en este trabajo podemos conjeturar las caras de crecimiento cristalino de oxalato de calcio. La figura 6 presenta la morfología y las caras de crecimiento cristalino correspondientes al oxalato de calcio. El grupo control muestra se puede observar la morfología regular de estos cristales y las presuntas caras de crecimiento  $\{100\}$ ,  $\{010\}$  y  $\{121\}$  que no presentan defectos en su superficie. Al agregar  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de péptido, se puede observar que las presumibles caras de crecimiento cristalino  $\{100\}$  y  $\{121\}$  presentan defectos e incluso fracturas en su superficie, así mismo se observan estructuras cristalinas irregulares. Al aumentar la concentración del péptido a  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , se puede observar que la presunta cara de



---

crecimiento cristalino {100} se encuentra porosa y que los defectos son más evidentes en la probable cara {121}, además, aumenta el número de las estructuras cristalinas irregulares.

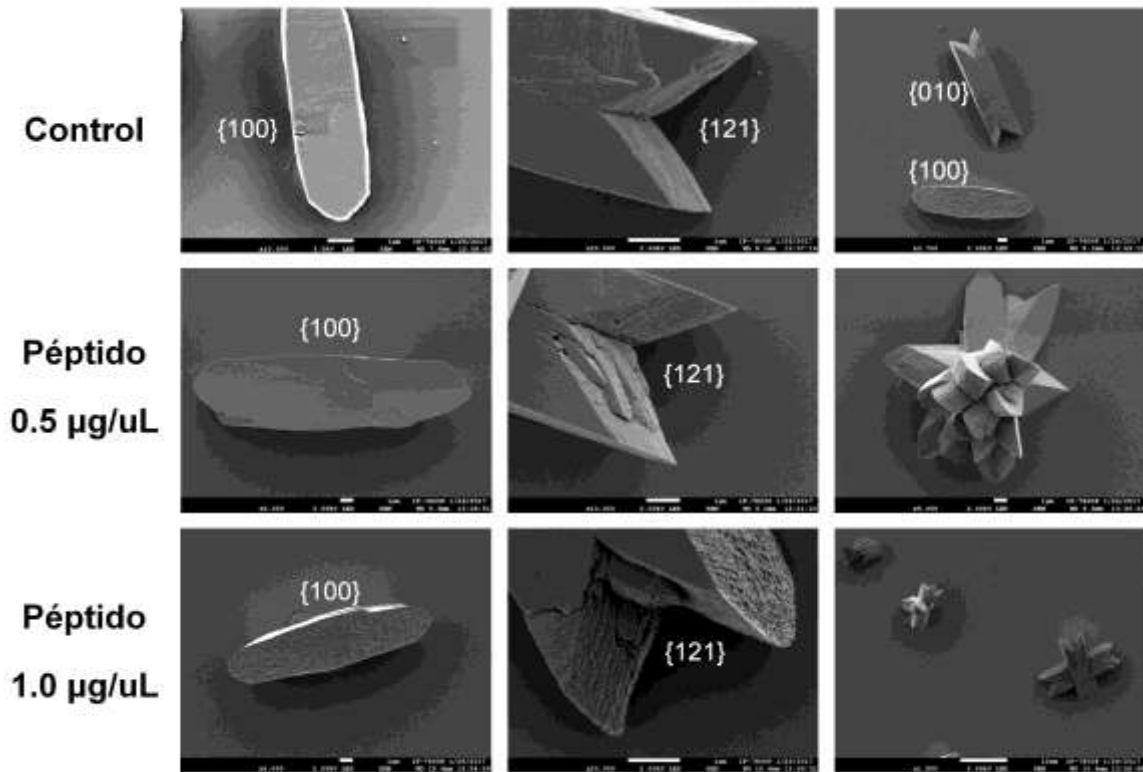
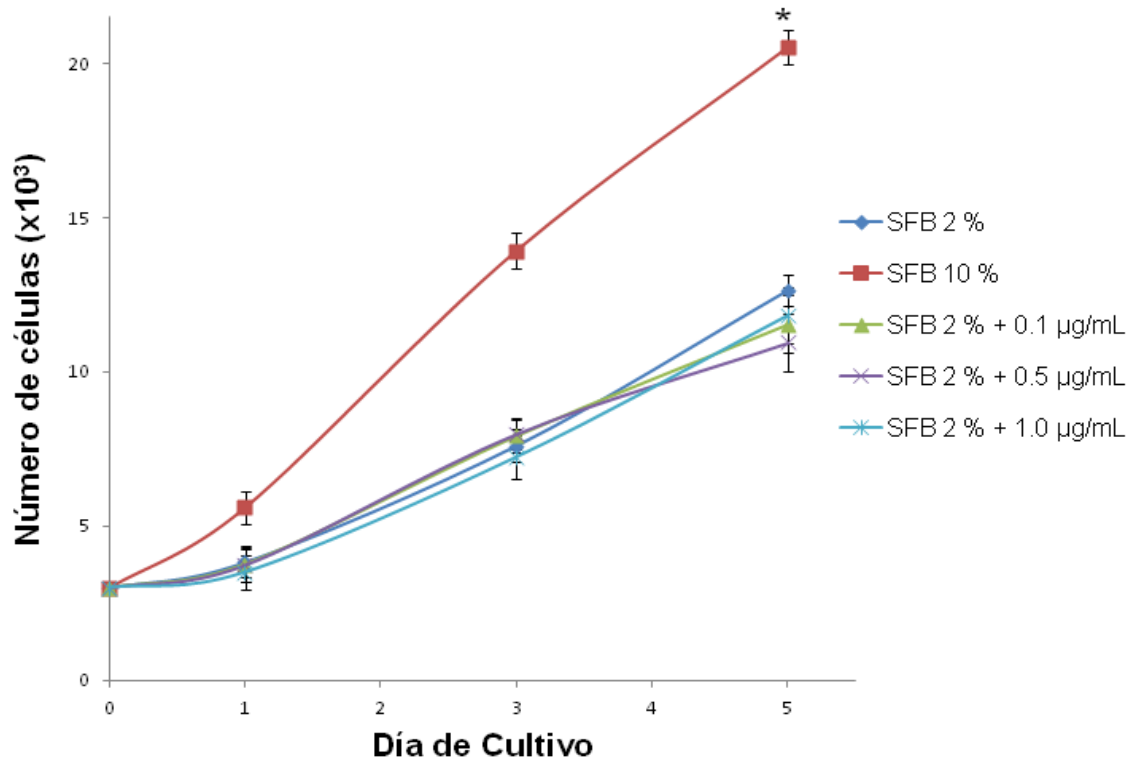


Figura 6. Efecto del péptido sobre la superficie del cristal. Se muestra las imágenes más representativas para cada grupo experimental

- Efecto de péptido sobre osteoblastos humanos

En la gráfica 10 se puede observar la proliferación de los osteoblastos durante el ensayo bajo las diferentes condiciones. El grupo control cultivado con DMEM + 10%SFB nos permite observar algún efecto mitogénico por parte del péptido. De manera similar, el grupo control cultivado con DMEM + 2%SFB, nos permite dilucidar un efecto tóxico agudo por parte del péptido. Los osteoblastos cultivados en presencia de las diferentes concentraciones del péptido presentan una proliferación similar al grupo control cultivado con DMEM + 2%SFB. El análisis estadístico no mostró diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre estos grupos, por lo cual se puede establecer que el péptido no posee un efecto toxico a osteoblastos.



Gráfica 10. Osteoblastos cultivados con diferentes concentraciones de péptido. Se reporta el valor promedio (n=3)  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0.05$ ).

- Efecto del péptido sobre la deposición de nódulos de calcio

Los nódulos de calcio son el producto de la biomineralización realizada por los osteoblastos. La figura 7 recopila las imágenes tomadas a los osteoblastos con diferentes condiciones de cultivo y en los diferentes días. EL grupo control, cultivado con medio mineralizante muestra una mayor deposición de nódulos de calcio en comparación con el grupo control negativo, complementado con PPI (quelante de ion calcio) y los grupos cultivados en presencia del péptido a 0.5 y 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . De igual manera, podemos notar que los grupos cultivados en presencia del péptido existe una proporción de nódulos de calcio similar a lo observado al grupo complementado con PPI. Posteriormente, se realizó la cuantificación del colorante, se puede observar en la gráfica 11 que en presencia del péptido existe una menor cantidad de nódulos de calcio en comparación con el grupo cultivado con medio mineralizante, también se puede notar que este efecto no es dependiente de la concentración del péptido debido a que la absorbancia en ambos grupos cultivados con péptido es análogo.

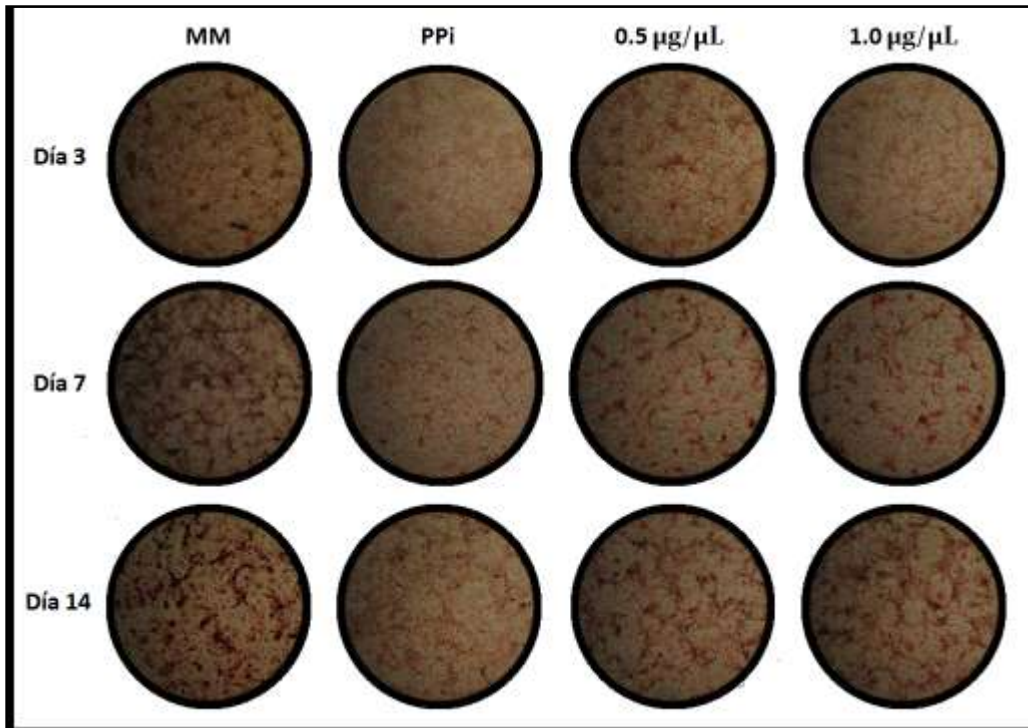
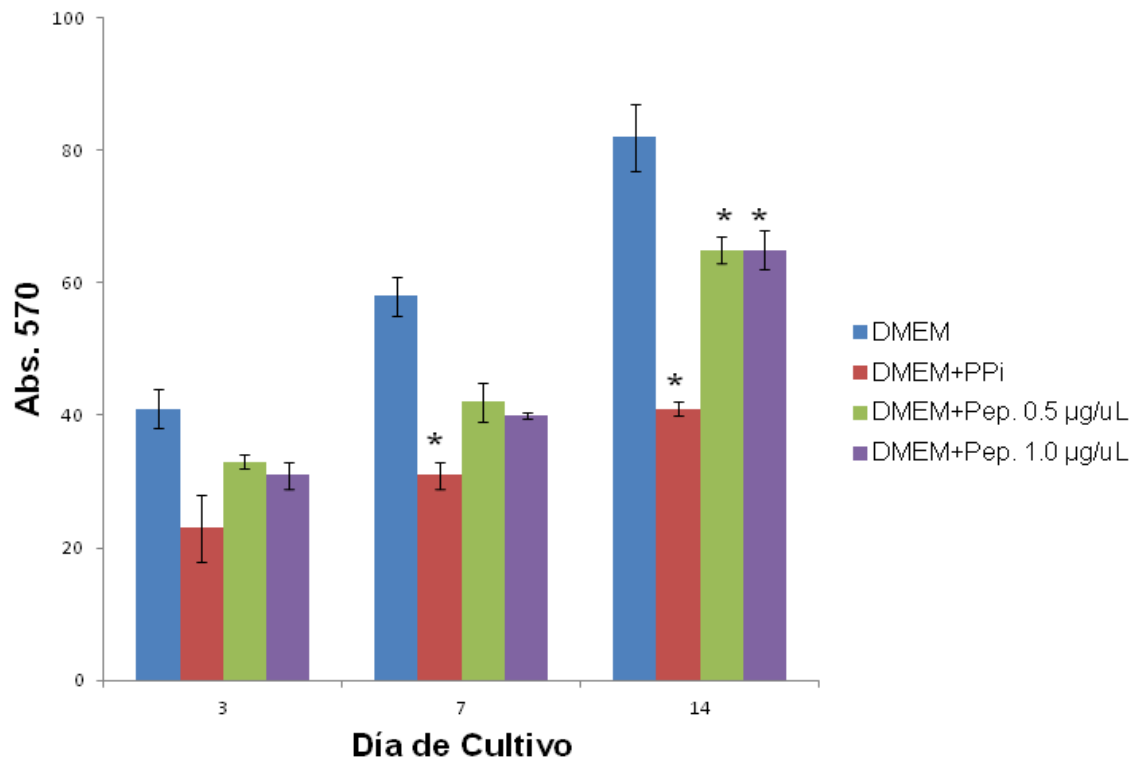


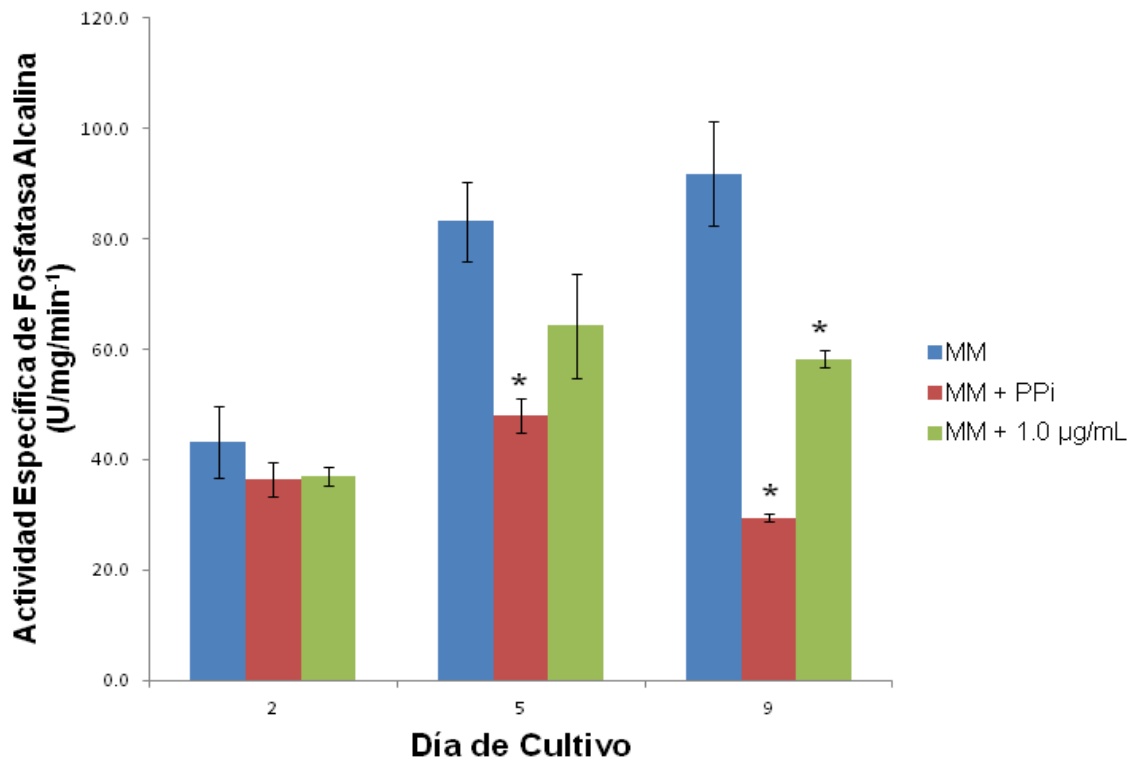
Figura 7. Efecto del péptido sobre la deposición de nódulos de calcio



Gráfica 11. Cuantificación de nódulos de calcio a través de alizarina roja S. Se reporta el valor promedio (n=3)  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0.05$ ).

- Actividad específica de fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina ósea es una isoenzima que corresponde al 40% de la fosfatasa alcalina total, y es un indicador temprano de la actividad metabólica de osteoblastos, ya que juega un papel muy importante en la mineralización y en la formación osteoide. La gráfica 12 muestra la actividad de fosfatasa alcalina con diferentes condiciones de cultivo. En el grupo control positivo, la actividad de esta enzima se ve disminuida. De manera similar, en presencia del péptido se disminuye la actividad de la fosfatasa alcalina en comparación con el grupo control cultivado únicamente con medio mineralizante (MM), observándose menor actividad de esta enzima en el último día de cultivo.



Gráfica 12. Actividad específica de fosfatasa alcalina. Se reporta el valor promedio (n=3) ± desviación estándar (p<0.05).

- 
- Expresión génica a nivel transcripcional

El factor de transcripción específico de osterix (OSX) es relevante en proceso de la biomineralización debido a que activa un repertorio de genes durante la diferenciación de preosteoblastos a osteoblastos y osteocitos maduros, líneas celulares encargadas de realizar biomineralización. La expresión de esta proteína es constante durante toda la vida del osteoblasto<sup>[33]</sup>. La sialoproteína ósea (BSP) es un componente importante de la matriz mineralizada del hueso, dentina, cemento y cartílago calcificado. Esta proteína juega un papel importante en la biomineralización y en la matriz extracelular regulando la maduración de los cristales de hidroxiapatita y se encuentran asociada a la nueva formación de tejido mineral. El nivel de expresión de esta proteína va en aumento hasta alcanzar un pico a los 14 días de cultivo, posteriormente disminuye<sup>[27]</sup>. La proteína morfogénica ósea (BMP II), la proteína del cemento radicular 1 (CEMP 1) y la proteína de adhesión al cemento radicular (HACD1/CAP), al igual que BSP y OSX, son importantes en la biomineralización debido a que promueven la diferenciación celular hacia linajes osteogénicos, migración celular, andherencia celular o regulando la maduración de los cristales de hidroxiapaptita<sup>[28] [37] [41]</sup>. Estas cinco proteínas poseen como común denominador estar involucradas en el proceso inicial de la biomineralización.

La figura 8 recopila los Western Blot realizados para las proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización BSP, BMP II, CEMP1, HACD1/CAP, OSX y la proteína GADPH como control de carga. No se observa diferencia estadísticamente significativa bajo las diferentes condiciones y días de cultivo para cada proteína.

Las gráficas 13 a la 17 se realizaron tomando en cuenta la intensidad de pixeles por área de las bandas y se normalizaron los datos respecto al grupo control cultivado con medio mineralizantes (MM) de cada tiempo, además, se realizó una comparación entre ellas, verificando las diferencias en la expresión de las proteínas. Las gráficas 13 a la 17 indican la expresión relativa de las proteínas de interés bajo las condiciones de cultivo: piro fosfato (PPI), 0.5 µg/mL y 1.0 µg/mL de péptido a 3, 7 y 14 días decultivo. Las gráficas muestran que tanto en el grupo control positivo (PPI) como los grupos experimentales (0.5 µg/mL y 1.0 µg/mL de péptido) muestran una menor expresión (solamente 80-85%) de las proteínas de interés con respecto al grupo control cultivado con medio mineralizante (MM)

al tercer día de cultivo. Sin embargo la expresión de las proteínas aumenta en el día 7 y aumenta ligeramente más para el último día de cultivo, siendo esta expresión similar a la del grupo control (95-100% de expresión). Sin embargo, no se observa diferencia estadísticamente significativa bajo las diferentes condiciones y días de cultivo para cada proteína.

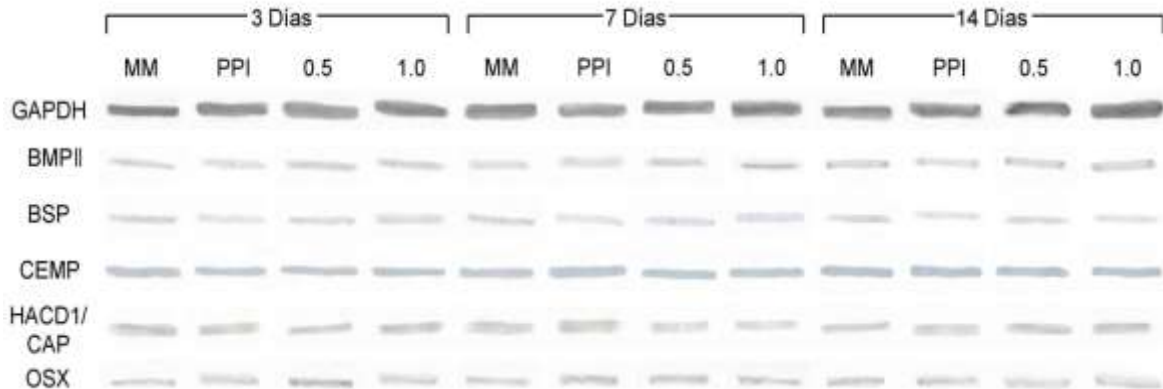
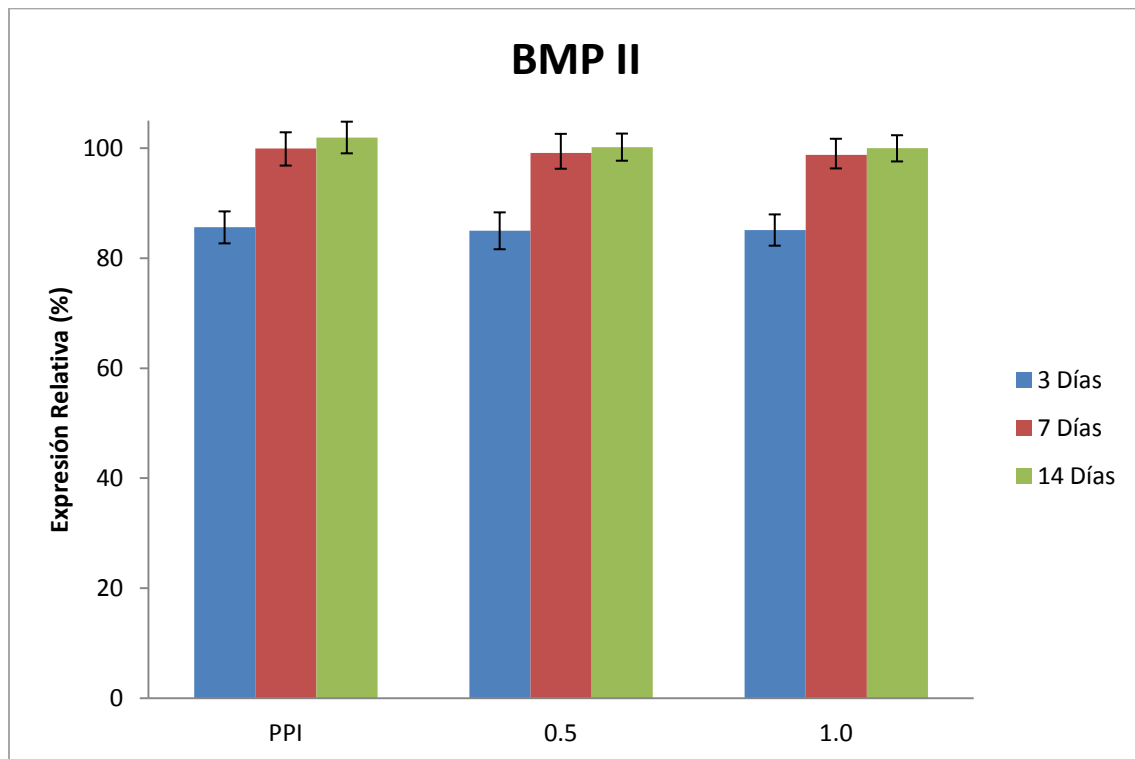
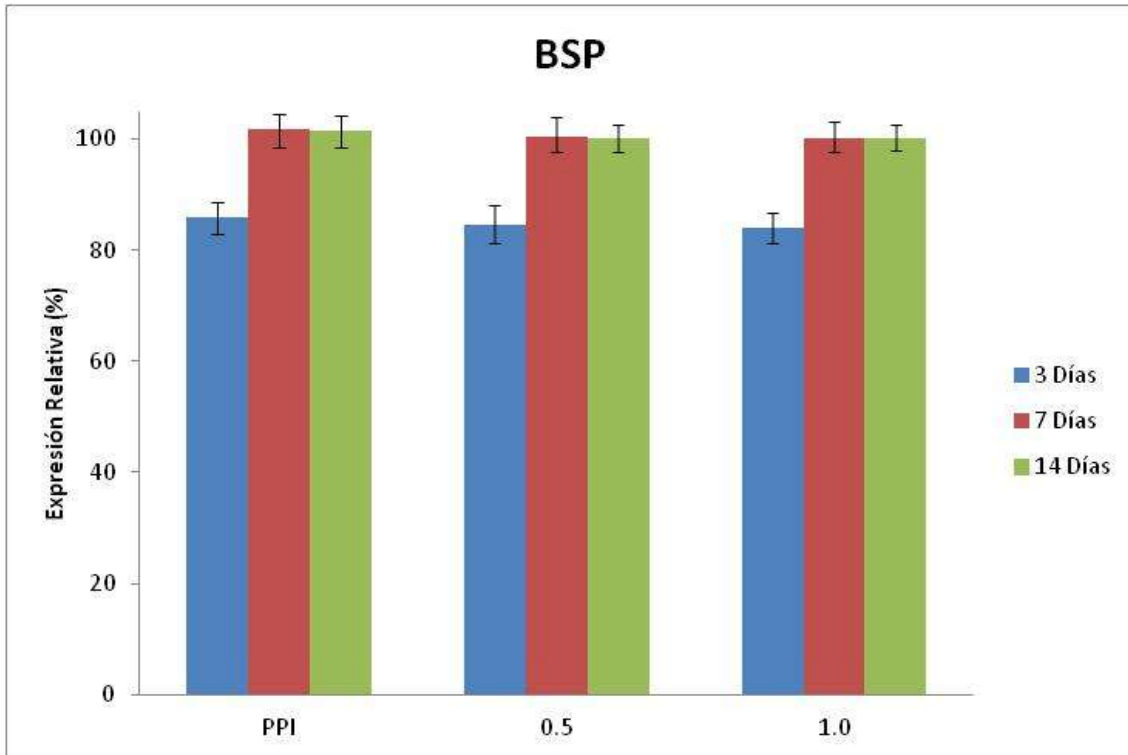


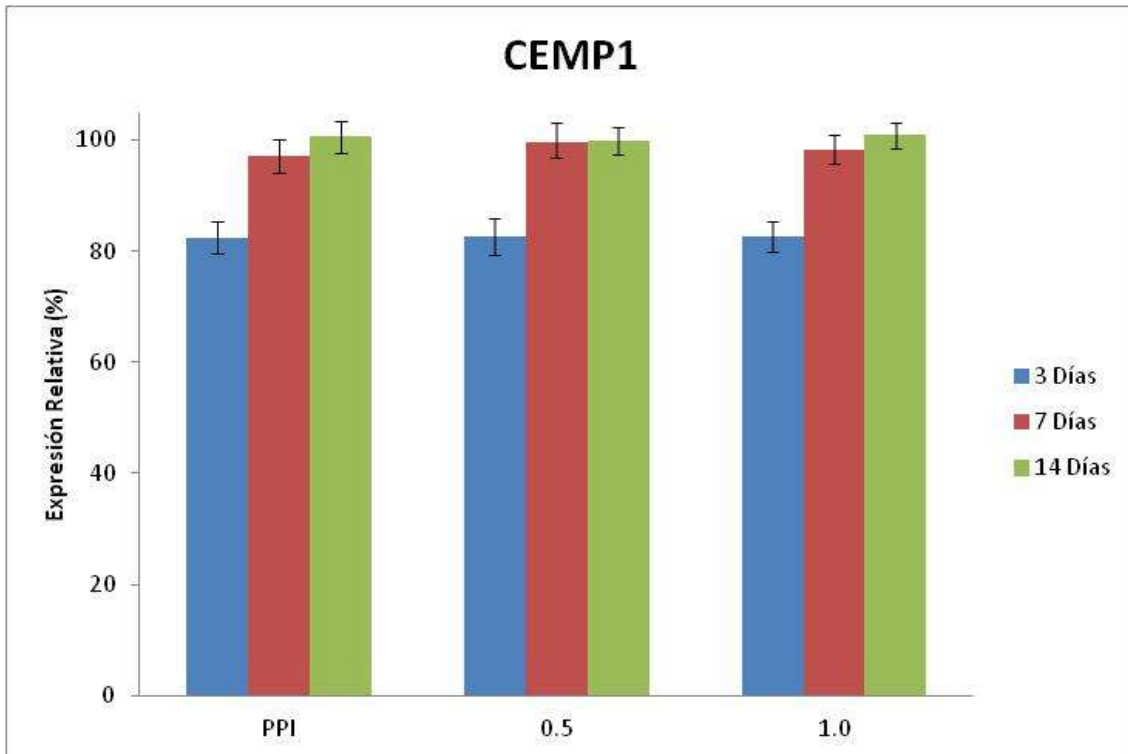
Figura 8. Comparación de las bandas de Western Blot de las proteínas de interés bajo diferentes condiciones y tiempos.



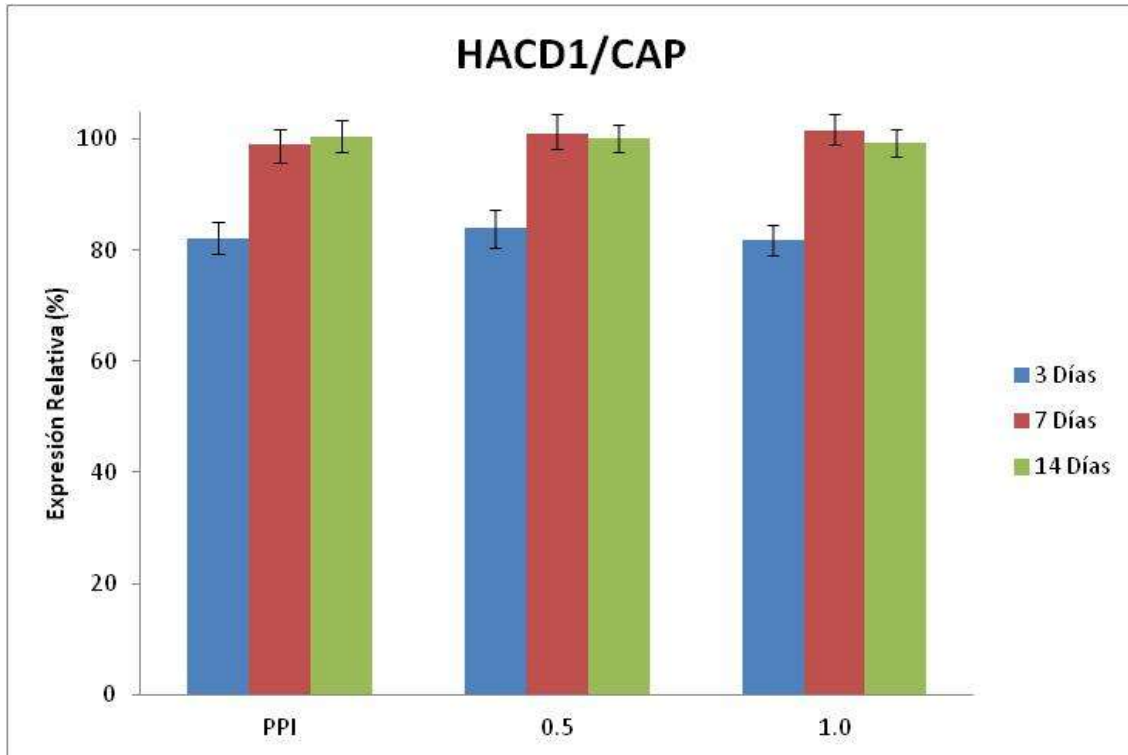
Gráfica 13. Gráfica de expresión relativa la proteína BMP bajo las condiciones de medio mineralizante (MM), piro fosfato (PPI), 0.5 µg/mL y 1.0 µg/mL de péptido a 3, 7 y 14 días. Se reporta el valor promedio ± desviación estándar ( $p > 0.05$ ).



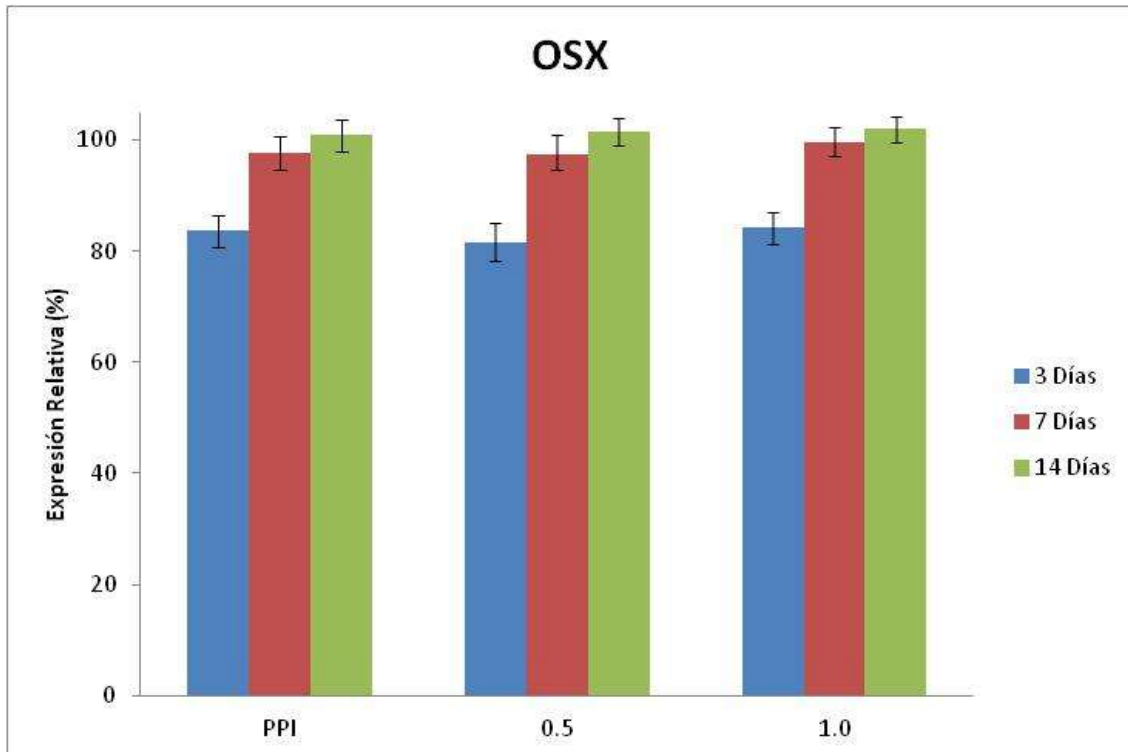
Gráfica 14. Gráfica de expresión relativa la proteína BSP bajo las condiciones de medio mineralizante (MM), piro fosfato (PPI), 0.5 µg/mL y 1.0 µg/mL de péptido a 3, 7 y 14 días. Se reporta el valor promedio ± desviación estándar ( $p > 0.05$ ).



Gráfica 15. Gráfica de expresión relativa la proteína CEMP1 bajo las condiciones de medio mineralizante (MM), piro fosfato (PPI), 0.5 µg/mL y 1.0 µg/mL de péptido a 3, 7 y 14 días. Se reporta el valor promedio ± desviación estándar ( $p > 0.05$ ).



Gráfica 16. Gráfica de expresión relativa la proteína HACD1/CAP bajo las condiciones de medio mineralizante (MM), piro fosfato (PPI), 0.5 µg/mL y 1.0 µg/mL de péptido a 3, 7 y 14 días. Se reporta el valor promedio ± desviación estándar ( $p > 0.05$ ).



Gráfica 17. Gráfica de expresión relativa la proteína OSX bajo las condiciones de medio mineralizante (MM), piro fosfato (PPI), 0.5 µg/mL y 1.0 µg/mL de péptido a 3, 7 y 14 días. Se reporta el valor promedio ± desviación estándar ( $p > 0.05$ ).



---

## Análisis de resultados

El péptido MASSDEDGTNGGASE derivado de la proteína HACD1/CAP contiene 4 residuos de aminoácido hidrófobos (1 Metionina, 2 Alaninas, 1 Treonina) distribuidos a lo largo de la cadena peptídica, por lo cual se puede considerar que posee un grado de hidrofobicidad baja (5.63) en contraste con la proteína HACD1/CAP completa (83.69), posee buena solubilidad en agua. En suspensión acuosa, estos residuos de aminoácidos pueden interaccionar intra e inter péptido para disminuir el contacto con agua, permitiendo el ensamblaje del péptido en estructuras similares a micelas. Por otra parte, el péptido estudiado, posee 3 residuos de Glicinas aproximadamente en la parte intermedia de la cadena. La Glicina es un aminoácido no quiral, debido a su tamaño otorga flexibilidad a las estructuras proteicas y peptídicos permitiendo plegamientos. Además, el péptido se encuentra compuesto por 5 residuos de aminoácidos polares sin carga (3 Serinas, 1 Treonina, 1 Asparagina), estos pueden establecer puentes de hidrogeno inter e intra péptido, permitiendo formar estructuras tridimensionales. Estas características en conjunto, podrían explicar el auto plegamiento observado en los estudios de MFA y como al aumentar la concentración del péptido estas pequeñas esferas observadas en la figura 2 se van aglomerando, por la interacción de los aminoácidos hidrofóbicos y los puentes de hidrogeno de los aminoácidos polares sin carga, hasta formar las estructuras de gran tamaño observadas en las figuras 3 y 4. Como se mencionó antes, estos tamaños de partícula que van desde los 20 nm hasta los 500 nm o 1000 nm son congruentes con los tamaños observados en los estudios de dispersión dinámica de luz.

Gonzalo Montoya, et. al. <sup>[43]</sup>, realizaron estudios de MFA a la proteína HACD1/ CAP observado que se autoensambla en estructuras esféricas, estas estructuras se encontraban interaccionando entre ellas formando cuerdas. También nos indican que estas cuerdas se alinean para formar una ultraestructura similar a una red. Concluyen que esta ultraestructura podría ser de alta relevancia en la actividad nucleadora de esta proteína, debido a que es capaz de interaccionar con las caras de crecimiento cristalino y promueva la deposición de iones que permitan el crecimiento de cristal. Para el caso del péptido derivado de HACD1/CAP, los estudios de MFA, indico que las bajas concentraciones permite el autoplegamiento del péptido en esferas, estas esferas se aglomeran entre ellas al aumentar la concentración del péptido, sin embargo no forman estructuras similares a

---

redes. Esta diferencia entre el tipo de ultraestructura que establece podría explicar el comportamiento opuesto del péptido con respecto a la proteína.

Ahora bien, el péptido posee 4 aminoácido de carga negativa en pH fisiológico (2 aspartatos, 2 ácidos glutámicos). Es importante señalar que la región central del péptido está compuesta por Aspartato, Acido glutámico, Aspartato (región DED). Esta región DED, junto con el alto contenido de glicinas que le otorga gran flexibilidad, contribuye a la explicación del efecto inhibitor en la formación de cristales de HA y OXCa. Estos cristales, al estar formados por calcio, poseen en superficie carga positiva que atrae la región DED del péptido, el cual puede adsorberse en la superficie, impidiendo el crecimiento. Este hecho es observable en los estudios de formación y crecimiento de hidroxiapatita así como en la formación de oxalato de calcio, en los cuales, la presencia del péptido inhibió la formación y crecimiento de los cristales estudiados respectivamente. Sin embargo este efecto es solo posible a bajas concentraciones del péptido. Es en estas concentraciones donde el plegamiento en estructuras de pequeño tamaño permite recubrir eficientemente la superficie de crecimiento cristalino. Las concentraciones mayores forman estructuras de gran tamaño que impiden la interacción entre el péptido y el cristal. Posiblemente se deba a que el autoplegamiento del péptido a bajas concentraciones permita mantener disponible la región DED para interactuar con cargas positivas mientras que en las estructuras de mayor tamaño, estas regiones del péptido se encuentren apantalladas entre ellas impidiendo la interacción con el cristal.

Graeme K. Hunter <sup>[67]</sup> nos indica que proteínas que regulan la biomineralización como osteopontina, deben su efecto inhibitorio en la formación y crecimiento de hidroxiapatita a no poseer una estructura secundaria definida (se trata de una proteína intrínsecamente desordenada), su alto contenido de aminoácidos de carácter ácido (específicamente Aspartato) y capacidad para adsorberse a la cara de crecimiento cristalino. Por otra parte, Shiyang Li and Lijun Wang <sup>[68]</sup> realizaron estudios *in vitro* de formación y crecimiento de hidroxiapatita usando péptidos derivados de osteopontina con alto contenido de aspartato sin fosforilación y con tres diferentes grados de fosforilación. Mediante este estudio observaron que todos los péptidos poseían un grado de inhibición de la mineralización y que al aumentar el grado de fosforilación se agrava este efecto. Los autores nos explican que la carga negativa del péptido sencillo o fosforilados le permite interactuar con

---

gránulos de calcio-fosfato impidiendo la aglomeración de estas y por ende la formación de cristales se ve afectada. Esto concuerda con nuestro planteamiento que la región DED del péptido derivado de la proteína HACD1/CAP es la responsable de su efecto inhibitorio.

Podemos asegurar que las bajas concentraciones poseen una mayor eficiencia de inhibición en la formación y crecimiento de cristales debido al marcaje de la proteína y los estudios realizados con microscopia confocal. En la gráfica 7, la concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  posee un valor de afinidad similar a las concentraciones de 3, 10, 15 y 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , la diferencia es que estas últimas concentraciones no poseen la misma eficiencia de inhibición. Esta concentración fue la referencia para realizar los estudios de adsorción del péptido marcado con Alexa-fluor 488, donde se puede observar que las bajas concentraciones de péptido pueden adsorberse en la superficie de cristales de HA y OxCa.

Adam Taller y colaboradores <sup>[65]</sup>, realizaron estudios de adsorción de osteopontina marcada con Alexa Fluor 488 en cristales de oxalato de calcio utilizando microscopia confocal. Sus resultados demostraron que esta proteína de carga negativa se une a las caras de crecimiento cristalino  $\{010\}$  y  $\{100\}$  del OxCa, este comportamiento también lo ejerce el péptido utilizado en este proyecto (figura 5). El investigador Yung-Ching Chien et. al. <sup>[69]</sup> efectuaron estudios de adsorción de un péptido rico en aspartato derivado de osteopontina observando un comportamiento similar. Ellos además realizan un modelaje molecular de la interacción entre las caras donde se adsorbe el péptido y cuáles son los átomos que se encuentran sobre la superficie de estas caras. Su Modelo indicó que los Aspartatos del péptido son los que interactúan con el calcio que se encuentra en la cara de crecimiento cristalino. Estos datos refuerzan la teoría de que la región DED juega un papel importante en la adsorción del péptido a caras de crecimiento cristalinas específicas, inhibiendo su crecimiento.

La adsorción del péptido sobre la cara de crecimiento cristalino de OxCa (figura 6) provocó anomalías en la superficie como fracturas e incluso erosiones a bajas concentraciones, debido a que el péptido al adsorberse en la cara de crecimiento cristalino impide que se depositaran los iones que permiten continuar el crecimiento del cristal.

---

Así mismo se pudo observar la presencia de estructuras llamadas maclas, son una agregación regular de cristales individuales del mismo mineral que presentan diferentes orientaciones, con mayor abundancia en presencia del péptido. El investigador Bernd Grohe y colaboradores <sup>[66]</sup>, observaron el efecto de osteopontina sobre las caras de crecimiento cristalino de OxCa a través de microscopía electrónica de barrido. Sus resultados demostraron que osteopontina es capaz de alterar la estructura de las presumibles caras {100}, {010} y {121} similares a las observadas con el péptido derivado de la proteína HACD1/CAP.

Hablando sobre el efecto del péptido en osteoblastos (gráfica 10) podemos indicar que no induce algún efecto sobre la proliferación de las células, lo cual indica que el péptido no posee un efecto tóxico. Los estudios del péptido en la deposición de nódulos de calcio nos indicaron que la región DED además de interactuar con superficies de carga positiva, también es capaz de quelar cationes. Este hecho se puede deducir de los resultados de la figura 7 donde usamos como control positivo al PPI, un quelante de calcio. Al comparar los resultados del grupo de osteoblastos cultivados en presencia de PPI y péptido a bajas concentraciones, mostraron poseer un comportamiento similar, es decir, ambos disminuyen la deposición de nódulos de calcio (gráfica 11).

La fosfatasa alcalina es una enzima necesaria en la biomineralización, la podemos localizar en las VB y la ALP se activa posteriormente a un aumento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la vesícula por acción de Anexina V. El PPI es un compuesto que se produce en la biomineralización por la ruptura del ATP por las ATPasas y el aumento de PPI tiene un efecto negativo en la biomineralización debido al carácter quelante de la molécula que disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  disponible dentro de la VB. Los osteoblastos cultivados en presencia de PPI y péptido tuvieron una menor actividad de fosfatasa alcalina. Esta disminución pudo haberse debido al efecto quelante del péptido, sin embargo, no se puede descartar de algún otro efecto del péptido sobre el proceso de biomineralización como una interacción con Anexina V lo cual disminuiría la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  disponible en la VB para iniciar la biomineralización.

---

William N. Addison et. al. <sup>[70]</sup>, realizaron estudios del efecto de PPI sobre la mineralización de osteoblastos así como en la actividad de ALP. Observaron que la adición de PPI en medio mineralizante inhibía tanto la mineralización de hidroxiapatita, así como la actividad de ALP. Indican que si bien no pueden dar una explicación concreta de estos efectos, lo pueden atribuir a la capacidad del PPI para unirse a los cristales de HA.

Además, William N Addison y colaboradores <sup>[71]</sup>, efectuaron investigaciones donde evaluaron el efecto de un péptido rico en serina y aspartato sobre proteínas involucradas en la biomineralización como colágena, ALP, BSP y OCN. Sus resultados indicaron que cultivar osteoblastos en presencia de su péptido no aumentó o disminuyó de manera notable la expresión de estas proteínas. Sin embargo, otros ensayos *in vitro* de este mismo péptido demostraron que posee un carácter inhibitorio en la formación de HA. Los autores atribuyen efecto a su capacidad de unirse con el cristal de hidroxiapatita en la vesícula de biomineralización, además indican que la fosforilación de los residuos de serina aumenta la inhibición.

Referente a la expresión de proteínas involucradas en la biomineralización como BSP, BMP II, CEMP1, HACD1/CAP y OSX, es importante mencionar que si bien algunas proteínas se localizaron e identificaron en algún tejido o célula de un órgano en específico, actualmente se sabe que la producción de una proteína no es exclusiva de un linaje celular. Tal es el caso de CEMP1 y HACD1/CAP que fueron identificadas en células del periodonto como cementoblastos, también pueden ser producidas por osteoblastos. Respecto al perfil de expresión de estas proteínas, podemos señalar que OSX, en preosteoblastos, los niveles de expresión son menores en comparación con osteoblastos, y a partir de que el preosteoblasto se ha diferenciado a osteoblasto el nivel de expresión de OSX es constante. Por otra parte, se ha observado que los niveles de expresión de BSP, BMP II, CEMP1, HACD1/CAP aumentan continuamente hasta tener un pico de expresión en los 14 días de cultivo y se ve disminuido para el día 21. Observado los resultados obtenidos en la figura 8, no podemos diferenciar niveles de expresión para las diferentes proteínas, por lo cual se realizó análisis de intensidad de pixeles (gráficas 13-17) donde podemos observar una tendencia en los niveles de expresión de las proteínas evaluadas.

---

Es decir, para cada una de las condiciones evaluadas (PPI, 0.5 y 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), en el tercer día de cultivo se ve una marcada disminución en la expresión de la proteína, sin embargo en el día 7 hay un aumento de la expresión, alrededor de un 20% para cada proteína, y en el 14 existe un ligero aumento, aproximadamente 5% para cada proteína. Se realizaron análisis estadísticos para la expresión de las proteínas de interés, comparando los días de cultivo y las condiciones, sin embargo no se encontró una diferencia estadísticamente significativa. Es decir, el péptido no posee un efecto sobre la expresión de proteínas involucradas en la biomineralización, sin embargo, Como habíamos mencionado antes, el péptido bajo las concentraciones evaluadas, posee la capacidad de interactuar con superficies de carga positiva, quelar cationes y posiblemente interactuar con Anexina V. Se puede establecer que el efecto inhibitorio del péptido es debido a su capacidad de interactuar con los cristales.

Este hecho nos indica que el péptido podría ser usado para inhibir el crecimiento de cristales de origen patológico como el oxalato de calcio sin afectar gravemente el proceso de biomineralización de osteoblastos.

Ahora bien, tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas del péptido, que le permiten interactuar con ion calcio, su interacción con los cristales de HA y como la presencia del péptido en los cultivos de osteoblastos afectan la deposición de nódulos de calcio y la actividad de fosfatasa alcalina, podríamos suponer que el efecto del péptido se encuentra ligado al proceso de biomineralización en las vesículas de biomineralización.

---

## Conclusión

A través de los estudios realizados podemos indicar que se ha cumplido con los objetivos planteados en el presente proyecto. Con los resultados obtenidos, podemos sugerir que el péptido es capaz de interactuar con cargas positivas, como iones o superficies, disminuyendo la formación y crecimiento de cristales. De igual manera, puede adsorberse en caras de crecimiento cristalino provocando defectos como fracturas o erosiones. No posee efecto en la proliferación de los osteoblastos, pero si participa en la maduración de la matriz ósea reflejado por la deposición de los nódulos de calcio y disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina bajo concentraciones de 0.5 y 1  $\mu\text{g/mL}$  de péptido. Además, el péptido no afectó el nivel de expresión de proteínas involucradas en la biomineralización como BSP, BMP, CEMP1, HACD1/CAP u OSX. Por lo tanto, sugerimos que el efecto del péptido sobre la biomineralización es debido a su interacción con los cristales.

## Perspectivas

Realizar estudios de microscopia electrónica de transmisión en los cristales de oxalato de calcio y determinar de manera fehaciente las caras de crecimiento cristalino.

Realizar estudios comparativos con la secuencia peptídica realizando fosforilaciones en residuos de serina para observar el efecto de esta modificación en la inhibición de la formación y crecimiento de cristales de interés biológico.

Realizar estudios de farmacocinética y biodistribución en modelos animales, observando el efecto en el sistema biológico.

---

## Bibliografía

1. Sutter, T., et al., *Crystal nucleation and motion in an undercooled binary solution*. Current Opinion in Chemical Engineering, 2015. **7**: p. 1-5.
2. Turnbull, D., *Kinetics of Heterogeneous Nucleation*. The Journal of Chemical Physics, 1950. **18**(2): p. 198-203.
3. Katz, J.L., *Homogeneous Nucleation Theory and Experiment - a Survey*. Pure and Applied Chemistry, 1992. **64**(11): p. 1661-1666.
4. Sear, R.P., *Quantitative studies of crystal nucleation at constant supersaturation: experimental data and models*. CrystEngComm, 2014. **16**(29): p. 6506-6522.
5. Azzopardi, P.V., et al., *Roles of electrostatics and conformation in protein-crystal interactions*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9330.
6. Toth, G.I., et al., *Heterogeneous crystal nucleation: the effect of lattice mismatch*. Phys Rev Lett, 2012. **108**(2): p. 025502.
7. Jia, F., D. Zhao, and M. Wang, *Selective nucleation and self-organized crystallization*. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, 2016. **62**(2): p. 252-272.
8. Wang, T., et al., *Recent progress of continuous crystallization*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2017. **54**: p. 14-29.
9. Montel, G., et al., *New concepts in the composition, crystallization and growth of the mineral component of calcified tissues*. Journal of Crystal Growth, 1981. **53**: p. 74 - 99.
10. Lin, C., C. Rüssel, and S. Dai, *Chalcogenide glass-ceramics: Functional design and crystallization mechanism*. Progress in Materials Science, 2018. **93**: p. 1-44.
11. García-Garduño, M.V. and J. Reyes-Gasga, *La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica*. Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2006. **9**(2): p. 90 - 95.
12. Kawasaki, K., A.V. Buchanan, and K.M. Weiss, *Biomineralization in humans: making the hard choices in life*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 119-42.
13. Hale, J.E. and R.E. Wuthier, *The mechanism of matrix vesicle formation. Studies on the composition of chondrocyte microvilli and on the effects of microfilament-perturbing agents on cellular vesiculation*. J Biol Chem, 1987. **262**(4): p. 1916-25.
14. Cotmore, J.M., G. Nichols, and R.E. Wuthier, *Phospholipid--Calcium Phosphate Complex: Enhanced Calcium Migration in the Presence of Phosphate*. Science, 1971. **172**(3990): p. 1339-1341.
15. Anderson, H.C., et al., *Impaired Calcification Around Matrix Vesicles of Growth Plate and Bone in Alkaline Phosphatase-Deficient Mice*. The American Journal of Pathology, 2004. **164**(3): p. 841-847.
16. Sugawara, Y., et al., *Necessity of Enzymatic Activity of Alkaline Phosphatase for Mineralization of Osteoblastic Cells*. The Japanese Journal of Pharmacology, 2002. **88**(3): p. 262-269.
17. Ali, S.Y., S.W. Sajdera, and H.C. Anderson, *Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **67**(3): p. 1513-20.
18. Fleisch, H., et al., *Effect of condensed phosphates on calcification of chick embryo femurs in tissue culture*. Am J Physiol, 1966. **211**(3): p. 821-5.
19. Gerke, V. and S.E. Moss, *Annexins and membrane dynamics*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1357**(2): p. 129-54.



- 
20. Anderson, H.C., *Molecular Biology of Matrix Vesicles*. Clinical Orthopaedics and Related Reserch 1995(314): p. 266-280.
  21. Anderson, H.C., R. Grimella, and S.E. Tague, *The Role of Matrix Vesicles in Growth Plate Development and Biomineralization*. Frontiers in Bioscience 2005. **10**: p. 822-837.
  22. Stechschulte, D.J., Jr., et al., *Presence and specific concentration of carbonic anhydrase II in matrix vesicles*. Bone Miner, 1992. **17**(2): p. 187-91.
  23. Hunter, G.K. and H.A. Goldberg, *Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8562-5.
  24. Ganss, B., R.H. Kim, and J. Sodek, *Bone sialoprotein*. Crit Rev Oral Biol Med, 1999. **10**(1): p. 79-98.
  25. Malaval, L., et al., *Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis*. J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1145-53.
  26. Yang, Y., Q. Cui, and N. Sahai, *How does bone sialoprotein promote the nucleation of hydroxyapatite? A molecular dynamics study using model peptides of different conformations*. Langmuir, 2010. **26**(12): p. 9848-59.
  27. Kruger, T.E., A.H. Miller, and J. Wang, *Collagen scaffolds in bone sialoprotein-mediated bone regeneration*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 812718.
  28. Sampath, T.K., et al., *Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor-beta superfamily*. The Journal of Biological Chemistry, 1990. **255**(22): p. 13198-13205.
  29. Marie, P.J., F. Debais, and E. Hay, *Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling*. Histol Histopathol, 2002. **17**(3): p. 877-85.
  30. Geiger, M., R.H. Li, and W. Friess, *Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(12): p. 1613-29.
  31. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone morphogenetic proteins*. Growth Factors, 2004. **22**(4): p. 233-41.
  32. Nakashima, K., et al., *The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation*. Cell, 2002. **108**(1): p. 17-29.
  33. Koga, T., et al., *NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation*. Nat Med, 2005. **11**(8): p. 880-5.
  34. Tu, Q., et al., *Osterix overexpression in mesenchymal stem cells stimulates healing of critical-sized defects in murine calvarial bone*. Tissue Eng, 2007. **13**(10): p. 2431-40.
  35. Sinha, K.M. and X. Zhou, *Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation*. J Cell Biochem, 2013. **114**(5): p. 975-84.
  36. Pérez, M.A.A., et al., *Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line*. Journal of Structural Biology, 2003. **143**(1): p. 1-13.
  37. Komaki, M., et al., *Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells*. J Cell Physiol, 2012. **227**(2): p. 649-57.
  38. Maldonado, S., et al., *Cementum protein 1 (CEMP1) activates p38 and JNK during the mineralisation process by cementoblast-like cells in vitro*. Cell Biology International Reports, 2013: p. n/a-n/a.
  39. Bermudez, M., et al., *CEMP1 Induces Transformation in Human Gingival Fibroblasts*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0127286.
  40. Arzate, H., et al., *Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum*. FASEB J, 1992. **6**(11): p. 2990-5.
-

- 
41. Saito, M., et al., *Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis*. Bone, 2001. **29**(3): p. 242-8.
  42. Arzate1, H., et al., *Immunolocalization of a Human Cementoblastoma-conditioned Medium-derived Protein*. J Dent Res 2002. **81**(8): p. 541-546.
  43. Montoya, G., et al., *Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo*. Bone, 2014. **69**: p. 154-64.
  44. David, V., et al., *ASARM peptides: PHEX-dependent and -independent regulation of serum phosphate*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **300**(3): p. F783-91.
  45. Sodek, J., B. Ganss, and M.D. McKee, *Osteopontin*. Crit Rev Oral Biol Med, 2000. **11**(3): p. 279-303.
  46. Luo, G., et al., *Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein*. Nature, 1997. **386**(6620): p. 78-81.
  47. Vermeer, C., E.C.M. Cranenburg, and L.J. Schurgers, *Matrix Gla-protein: The calcification inhibitor in need of vitamin K*. Thrombosis and Haemostasis, 2017. **100**(10): p. 593-603.
  48. Zambrano, M.A. and L. Suárez, *Biofilms: implications in health and disease*. Universitas Odontológica Nº 57, 2006. **25**(57): p. 19-25.
  49. Grases, F., A. Costa-Bauza, and R.M. Prieto, *Renal lithiasis and nutrition*. Nutr J, 2006. **5**: p. 23.
  50. Atanassova, S.S. and I.S. Gutzow, *Hippuric acid as a significant regulator of supersaturation in calcium oxalate lithiasis: the physiological evidence*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 374950.
  51. Doyle, I.R., R.L. Ryall, and V.R. Marshaf, *Inclusion of proteins into calcium oxalate crystals precipitated from human urine a highly selective phenomenon*. Clinical Chemistry, 1991. **37**(9): p. 1589-1594.
  52. Rampoldi, L., et al., *The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease*. Kidney Int, 2011. **80**(4): p. 338-47.
  53. Wesson, J.A., et al., *Control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules*. Kidney Int, 1998. **53**(4): p. 952-7.
  54. Martín, M.A., et al., *Study of the physical-chemical factors in patients with renal lithiasis*. Arch. Esp. Urol., 2006. **59**(6): p. 583-594.
  55. Costa-Bauza, A., et al., *Factors affecting calcium oxalate dihydrate fragmented calculi regrowth*. BMC Urol, 2006. **6**: p. 16.
  56. Ishizaka, M., Y. Ohshima, and H. Yanagawa, *Protein anatomy: structure and function of peptide fragments corresponding to the secondary structure units of barnase*. J Biochem, 2001. **129**(6): p. 971-7.
  57. Mains, R.E. and B.A. Eipper, *Peptides*. 2012: p. 390-407.
  58. Llano, D.G.d. and C.P. áñez, *PEPTIDES*, in *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, B. Caballero, Editor. 2003, Academic Press: U. S. A. p. 4468 - 4473.
  59. Janairo, J.I.B., *Peptide-Mediated Biomineralization*, in *Peptide-Mediated Biomineralization*. 2016, Springer Briefs in Materials: Singapore. p. 72.
  60. Choi, N., et al., *The interplay of peptide sequence and local structure in TiO<sub>2</sub> biomineralization*. J Inorg Biochem, 2012. **115**: p. 20-7.
  61. Park, S., H. Lee, and S.Y. Lee, *Effect of peptide conformation on TiO<sub>2</sub> biomineralization*. Dalton Trans, 2013. **42**(38): p. 13817-20.
  62. Addison, W.N., et al., *Phosphorylation-dependent mineral-type specificity for apatite-binding peptide sequences*. Biomaterials, 2010. **31**(36): p. 9422-30.
-

- 
63. Carneiro, K., et al., *Roughness Parameters of Surfaces by Atomic Force Microscopy*. CIRP Annals, 1995. **44**(1): p. 517-522.
  64. Butt, H.-J., B. Cappella, and M. Kappl, *Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications*. Surface Science Reports, 2005. **59**(1-6): p. 1-152.
  65. Taller, A., et al., *Specific adsorption of osteopontin and synthetic polypeptides to calcium oxalate monohydrate crystals*. Biophys J, 2007. **93**(5): p. 1768-77.
  66. Grohe, B., et al., *Crystallization of calcium oxalates is controlled by molecular hydrophilicity and specific polyanion-crystal interactions*. Langmuir, 2009. **25**(19): p. 11635-46.
  67. Hunter, G.K., *Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation*. Calcif Tissue Int, 2013. **93**(4): p. 348-54.
  68. Li, S. and L. Wang, *Phosphorylated osteopontin peptides inhibit crystallization by resisting the aggregation of calcium phosphate nanoparticles*. CrystEngComm, 2012. **14**(23): p. 8037.
  69. Chien, Y.C., et al., *Modulation of calcium oxalate dihydrate growth by selective crystal-face binding of phosphorylated osteopontin and polyaspartate peptide showing occlusion by sectoral (compositional) zoning*. J Biol Chem, 2009. **284**(35): p. 23491-501.
  70. Addison, W.N., et al., *Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity*. J Biol Chem, 2007. **282**(21): p. 15872-83.
  71. Addison, W.N., et al., *MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(10): p. 1638-49.