



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LITERATURA DE
PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS INHIBIDORES DEL PROCESO
DE MINERALIZACIÓN.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS ODONTÓLOGICAS

P R E S E N T A:

C.D. ALBERTO MIMILA CORTES

TUTORES PRINCIPALES:

DR. GONZALO MONTOYA AYALA

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

Dr. HIGINIO ARZATE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., JUNIO DEL 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



“La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina al mundo”.

- Louis Pasteur



AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

A Dr. Gonzalo Montoya, por brindarme su espacio, su tiempo y orientación para mi desarrollo académico. Mi más grande agradecimiento por el profesionalismo, inspiración y apoyo incondicional que recibí de su parte desde el primer día que decidí continuar con mi camino en la investigación.

A Dr. Higinio Arzate, por el apoyo y asesoramiento en la bitutoría durante la realización de mi proyecto, además de siempre hacerme sentir miembro del laboratorio de Biología Periodontal FO DEPeI UNAM.

A Dr. Jesús Arenas y Dr. Luis Felipe Jiménez, por formar parte de mi comité tutor y siempre contar con su tiempo, observaciones y apoyo durante la presentación de mis avances de proyecto.

A Mtra. Guadalupe Ureiro, por siempre compartir su tiempo, experiencia y consejos valiosos durante mi camino en la maestría.

A mi amada Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de continuar mi vida académica y sentirme orgulloso de pertenecer a la máxima casa de estudios, mi segunda casa.

A los(as) coordinadores del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, agradeciendo su comprensión y asesoramiento durante las dificultades que se presentaron estos años, así logramos seguir adelante con mi presente proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo en la beca otorgada para mis estudios de maestría, con el número de CVU 1084378.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT-UNAM, con clave IN204120 y IN203920) por el apoyo otorgado para el desarrollo de este trabajo de tesis.



AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Dedicado a mi familia...

A mis padres, Alejandra y Gilberto, por siempre contar con su comprensión, apoyo y cariño para continuar con mis estudios y alentarme a lograr lo que me propongo en todo momento; esta meta conseguida es para ellos y para mi hermana Estephani, esperando devolverles lo mucho que me han dado. Soy lo que soy, y tengo lo que tengo, gracias a mi familia.

Dedicado a mis colegas...

A Fernando Ramírez, agradecer por su valiosa amistad, sus consejos y animo que me ha brindado desde el día 1, ambos dedicados a crecer y aprender uno con el otro, por lo que no pude pedir mejor compañero de camino.

A Isarai Mendieta, Lis Pando, Pavel Juárez y Julio Hernández, pasaron de ser compañeros a grandes amigos, gracias a todos por el apoyo, las anécdotas, el tiempo y dedicación que cada uno brindo, pudimos avanzar y colaborar de manera gratificante en la maestría e hicieron más amena esta etapa de mi vida.

Dedicado a los que siempre han estado, mis amigos...

A Rodrigo, Omar y Eduardo, agradecer su sincera amistad, el apoyo, sus palabras de ánimo, las vivencias y experiencias que hemos podido compartir. No queda más que agradecer de poder contar con grandes personas en mi vida.

A Kathia, porque ha estado en los momentos más difíciles y siempre me ha brindado apoyo y motivación para seguir adelante. Gracias por creer en mí y mostrarme lo que es la fortaleza con el vivo ejemplo.



ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	
2.1 BIOMINERALIZACIÓN	3
2.2 MINERALIZACIÓN ECTÓPICA	5
2.2.1 MECANISMOS PATOLOGICOS	6
2.3 PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS INHIBIDORES	8
2.4 MECANISMOS DE INTERACCIÓN DE FACTORES INHIBIDORES	9
2.4.1 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
4. JUSTIFICACION	11
5. HIPÓTESIS	12
6. OBJETIVO GENERAL	12
6.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	12
7. METODOLOGIA DE LA REVISIÓN SISTEMÁTICA	12
7.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE ESTUDIOS	13
7.1.1 TIPOS DE ESTUDIOS	
7.1.2 TIPOS DE PARTICPANTES.....	13
7.1.2.1 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	
7.1.2.2 ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	
7.1.3 TIPOS DE INTERVENCIONES	14
7.1.4 TIPOS DE MEDIDAS DE DESENLACE	
7.1.4.1 DESENLACES PRIMARIOS	14
7.1.4.2 DESENLACES SECUNDARIOS	14
7.2 MÉTODOS DE BÚSQUEDA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESTUDIOS	
7.2.1 ESTRATEGIAS DE BUSQUEDA	15
7.2.2 SELECCIÓN DE LOS ESTUDIOS	15
7.3 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS DATOS	16
7.3.1 EVALUACIÓN DE CALIDAD DE ESTUDIO	16
7.3.2 ANÁLISIS DE EVALUACIÓN DE CALIDAD	16
7.3.3 DATOS A EXTRAER	17
7.3.4 GENERACION DE LA EVIDENCIA	17
8. RESULTADOS	
8.1 ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE ESTUDIOS	18
8.2 DESCRIPCIÓN DE ESTUDIOS (Tablas de Resumen)	20
8.3 RIESGO DE SESGO	39
9. DISCUSIÓN	40
10. CONCLUSIONES	50
11. REFERENCIAS	51



1. RESUMEN

Antecedentes. La formación de calcificaciones en zonas ectópicas es un problema que aqueja a la población con enfermedades como afección renal crónica, aterosclerosis, diabetes y otros trastornos metabólicos. La evidencia científica muestra que células del músculo liso vascular pueden diferenciarse a un fenotipo similar al osteoblasto tras una exposición prolongada de estrés fisiológico, lo que conlleva a la formación de matriz mineralizante de manera patológica.

Actualmente, hay múltiples estudios que evalúan el efecto de proteínas como la osteopontina (OPN), proteína gla de la matriz (MGP) e incluso péptidos bioactivos que por sus características fisicoquímicas surgen como un potencial agente inhibidor; esto es, gracias a una posible interacción directa a nivel mineral o celular, por lo que es necesario analizar la eficacia de diferentes factores inhibidores de la mineralización estudiados en diferentes entornos experimentales.

Objetivo. Analizar la eficacia del empleo de proteínas y péptidos bioactivos como inhibidores de la mineralización bajo la revisión sistemática de estudios experimentales publicados en diferentes bases de datos.

Metodología. Los estudios elegibles se identificaron mediante la búsqueda manual en 3 bases de datos: MEDLINE (Portal de acceso PubMed), LILACS (Portal de acceso BVS) y SCOPUS (Portal de acceso BidiUNAM), sin aplicar restricciones en fechas de publicación, país ni idioma. Se incluyeron y analizaron ensayos experimentales en entornos *in vitro* (cristalización o cultivos celulares) e *in vivo* (modelos animales) que analizaran el empleo de proteínas y/o péptidos en la inhibición significativa de la mineralización (*in vitro*) y calcificaciones inducidas (*in vivo*).



Resultados. La búsqueda de artículos realizada dio como resultado la identificación de 1066 artículos potencialmente relevantes; de los cuales se realizó la revisión de títulos y resumen, así como de la eliminación de duplicados y estudios no experimentales o que no cumplían con los criterios de inclusión. Al final, se obtuvieron 48 artículos para la inclusión al análisis cualitativo de esta revisión sistemática.

Se analizaron 46 estudios *in vitro* y 4 *in vivo* (2 estudios realizaron ensayos en ambos entornos). Con la extracción y tabulación de datos, se mostró que la proteína más estudiada fue la OPN, seguida por la MGP y la fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE), en diferentes isoformas y/o péptidos derivados, mientras que el péptido VTK ha sido el más empleado mostrando resultados significativos en la inhibición de la mineralización en entornos *in vitro*.

Conclusiones. Con la realización de la presente revisión sistemática se pudo demostrar que, las moléculas polipeptídicas con un potencial inhibidor de la mineralización se caracterizan por poseer un punto isoeléctrico ≤ 4.8 , determinado por la presencia de aminoácidos ácidos (Aspartato y Glutamato); además, se ha demostrado que la presencia de modificaciones postraduccionales (por ejemplo fosforilaciones en sitios de serina) potencializa el efecto inhibidor de la mineralización. Sin embargo, aún se requiere evaluar el efecto de estas proteínas y/o péptidos bioactivos en entornos *in vivo*, lo que permitirá elucidar el posible mecanismo de acción de estas moléculas en el proceso de biomineralización.



2. INTRODUCCIÓN

2.1 Biomineralización.

La mineralización biológica es el proceso por el cual los organismos acumulan grandes cantidades de minerales y forman cristales complejos. La formación de los tejidos mineralizados se produce en casi todos los grupos de organismos, desde nanocristales de magnetita en ciertas bacterias, hasta biominerales en hueso y dientes de seres humanos.^{1,2}

El término biomineral se refiere a compuestos inorgánicos con una disposición de repetición regular de moléculas consistentes, ya sean átomos o iones, producidos bajo condiciones estrictamente controladas con propiedades magnéticas o eléctricas específicas; además son producto de la interacción de la fase mineral con la fase orgánica, determinando la morfología, tamaño y grado de cristalinidad.^{3,4}

El principal componente inorgánico en el ser humano es la hidroxiapatita, el cual es el biocristal principal de huesos y dientes, ya que les confiere su dureza característica. La hidroxiapatita presente en los tejidos mineralizados se ensambla bajo la influencia de una variedad de proteínas de matriz extracelular, que actúan como promotores o inhibidores del crecimiento cristalino, dando lugar a distintas fases cristalinas hasta llegar a su maduración.^{5,6}

La mineralización de los tejidos duros del cuerpo tiene lugar dentro de las vesículas de matriz de células especializadas (condroblastos, osteoblastos, odontoblastos y cementoblastos), las cuales son secretadas a partir de la superficie celular (**FIG 1**).³

Los iones de fosfato de calcio se acumulan dentro de las vesículas, donde eventualmente precipitan y forman cristales de hidroxiapatita. Estos cristales atraviesan la membrana de las vesículas y dan lugar a los nódulos de calcio en el fluido extracelular, para continuar el proceso de maduración y crecimiento mineral guiadas por las fibras de colágena (**FIG 1**).³

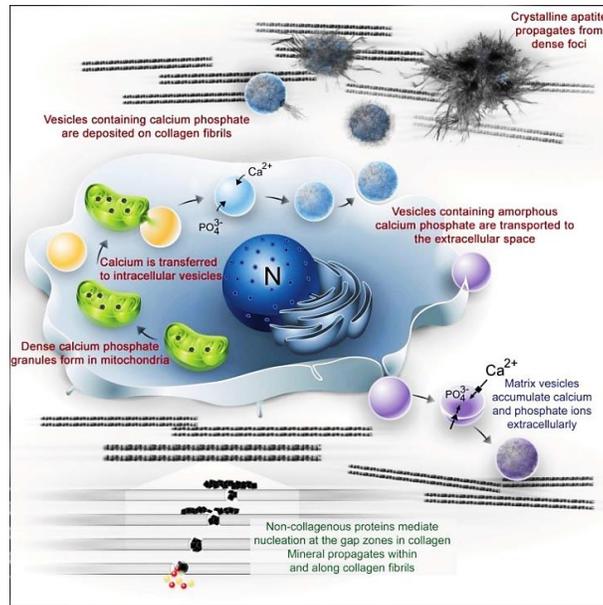


FIG 1. Esquema que resume los modelos actuales del mecanismo de mineralización en tejido óseo.⁷

El grado de maduración y crecimiento de los cristales está determinado por las condiciones extracelulares presentes y donde influyen de manera importante el pH, la concentración de iones de fosfato y calcio, así como la presencia de proteínas no colágenas de la matriz extracelular de cada tejido.³

La presencia de macromoléculas polipeptídicas cumple un rol esencial en el proceso de biomineralización, debido a que actúan como plantillas que imitan la red cristalina de una cara particular, facilitando así el crecimiento del mineral.⁴

Pero este mecanismo biológico en tejidos mineralizados tiene una contraparte aberrante, cuando hay formación de calcificaciones en tejidos blandos. Por lo que investigaciones recientes se han centrado en el estudio del mecanismo molecular y participación celular en el proceso de mineralización ectópica, debido a que es una de las principales complicaciones potencialmente mortales en pacientes con enfermedad renal crónica y diabetes, que también se asocia con una alta incidencia de morbilidad.⁸



2.2 Mineralización ectópica.

Las investigaciones actuales acerca de la formación de calcificaciones patológicas han permitido establecer que se trata de un proceso activo que está asociado a la expresión de factores de crecimiento, proteínas de matriz extracelular y otras moléculas relacionadas a células osteogénicas que dan lugar a la formación de depósitos minerales en zonas ectópicas (tejidos blandos), siendo una de las principales complicaciones en pacientes con enfermedades metabólicas.⁸

Uno de los mecanismos más reportados en la literatura científica es el estudio de células vasculares, ya que juegan un papel relevante en la patogenia de estas calcificaciones. Diversos estudios se han enfocado en la capacidad que poseen estas células de llevar a cabo una transición fenotípica hacia un linaje “osteoblástico”, al expresar marcadores osteogénicos (como el factor de transcripción RUNX2, osterix (OSX), osteopontina (OPN), osteocalcina (OC), fosfatasa alcalina (ALP), entre otros) en respuesta a diversos factores locales y circulantes (como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) o el estrés oxidativo).⁹⁻¹¹

Este proceso patológico conlleva a la acumulación de diferentes depósitos minerales, en mayor proporción de hidroxapatita, al demostrarse que diversos factores inhibidores tienen una alta afinidad al cristal, por la concentración de calcio; pero se han reportado otras fases minerales dependientes de la zona ectópica, como oxalato de calcio mono- y dihidratado en cálculos renales, brushita en cálculos dentales, además de whitlockita y apatita carbonatada en vasos sanguíneos y válvulas, lo que representa una complicación potencialmente mortal en enfermedades adquiridas y genéticas.^{8,10}



2.2.1 Mecanismos patológicos.

En condiciones fisiológicas, las células vasculares de musculo liso (VSMC, por sus siglas en inglés) secretan inhibidores endógenos de la calcificación (MGP, OPN, osteoprotegerina y pirofosfato); sin embargo, tras una exposición prolongada a condiciones de estrés (como inflamación, perturbaciones hormonales o trastornos metabólicos), las células pueden superar la capacidad de estos inhibidores y sufrir una diferenciación hacia un fenotipo similar al osteoblástico (**FIG 2**).¹²

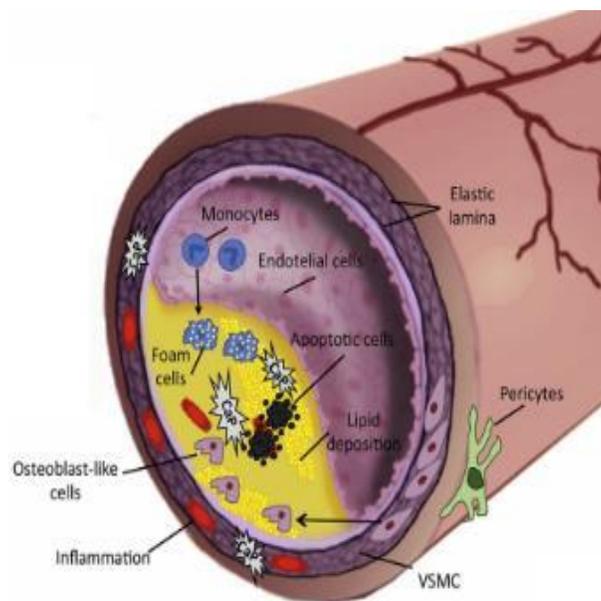


FIG 2. Esquema representativo de los componentes celulares y extracelulares, así como los factores que intervienen en la calcificación vascular.¹⁰

Además de esta plasticidad fenotípica mostrada por las VSMC, se ha demostrado que diversas interacciones moleculares entre proteínas y superficies cristalinas juega un papel importante en la inhibición de la mineralización, al ser facilitada por los iones multivalentes que generan un puente entre los grupos de carga opuestos de proteínas y los iones de la red cristalina de los minerales que se forman habitualmente.¹³



Tal es el caso de la formación de los cálculos renales, donde se ha reportado que las interacciones entre los constituyentes urinarios (proteínas principalmente) y los cristales de oxalato de calcio (que, junto con la hidroxapatita son el principal componente mineral de las calcificaciones), pueden influir en uno o más procesos críticos en la patogénesis de los cálculos, incluyendo la nucleación, el crecimiento, la agregación y la adhesión de los cristales y/o los agregados a las superficies epiteliales del riñón.¹⁴

Una variedad de constituyentes urinarios han surgido como posibles inhibidores de la agregación de cristales y de la adhesión celular, particularmente las proteínas aniónicas y los glicosaminoglicanos. Sin embargo, en algunos estudios también se ha reportado que las macromoléculas urinarias promueven la agregación de oxalato de calcio monohidratado (OCM) y/o su adhesión a las células epiteliales.¹³

Un caso más común es la formación de cálculo dental, el cual se debe a la precipitación y agregación de cristales a partir de los iones presentes en la saliva. La mineralización ocurre en la superficie del esmalte dental/biofilm, formando una capa mineralizada que representa un factor agravante para el desarrollo de la enfermedad periodontal (principalmente basada en la acumulación bacteriana).¹⁵

Por lo anterior, y aunque resulte impredecible la formación de las calcificaciones ectópicas, se ha demostrado que ciertos mecanismos celulares y moleculares guardan íntima relación, incluso si suceden en diferentes tejidos. Actualmente el campo de estudio se ha ampliado a la investigación de factores inhibidores que pueden tener interacciones molécula-célula o molécula-mineral e impedir el desarrollo patológico de depósitos minerales.

Por ejemplo, el pirofosfato actúa directamente en la actividad de los osteoblastos, inhibiendo la mineralización *in vitro* mediante al menos tres mecanismos distintos que incluyen la unión directa al mineral, el aumento de la producción de osteopontina (otro importante inhibidor) y la inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina.¹⁶



2.3 Proteínas y péptidos inhibidores.

En el estudio de factores inhibidores, ciertamente el pirofosfato es el más estudiado; sin embargo, aún no se conoce del todo su mecanismo inhibitorio, por lo que el campo de investigación se ha ampliado en la búsqueda de nuevos factores como lo son las moléculas polipeptídicas. Como se muestra en la **Tabla I**, diferentes estudios han reportado que proteínas con características químicas y estructurales específicas poseen un efecto dual durante la mineralización, debido a que pueden promover la formación y crecimiento mineral o, inhibir la formación de calcificaciones.

Tabla I. Proteínas y acciones reportadas en la mineralización.

PROTEINA	ACCION EN MINERALIZACION	REPORTADO
Osteonectina (ON)	Promoción / Inhibición	<i>Bradshaw, 2012¹⁷ / Moe et al. 2004¹⁸</i>
P. Morfogénica Ósea (BMP)	Promoción / Inhibición (BMP7)	<i>Hruska et al. 2005²⁰</i>
Osteopontina (OPN)	Inhibición	<i>Icer et al. 2018²²</i>
Osteocalcina (OC)	Inhibición / Estimulador celular	<i>Hauschka et al. 1989²³</i>

Un ejemplo claro es la osteonectina, la cual es una proteína que se ha reportado tener actividad inhibidora en la deposición de hidroxapatita. Pero, hay cierta controversia debido a que al ser secretada por varias células epiteliales y mesenquimales (como osteoblastos, fibroblastos, células endoteliales y del músculo liso vascular) se cree que esta proteína desempeña un papel en la angiogénesis, la morfogénesis y la reparación tisular.¹⁷⁻¹⁹

Mismo paradigma se ha reportado con la familia de proteínas morfogénicas óseas (BMP), que a pesar de sus similitudes de secuencia, ejercen una amplia gama de actividades biológicas, a veces, con efectos opuestos. Mientras que las BMP-4, 5, 6 y 9 tienen una clara capacidad osteogénica, la BMP-7 se ha reportado tener una actividad inhibitoria.²⁰



Una de las proteínas más estudiadas, por su efecto claro de inhibición en la formación de hidroxiapatita es la osteopontina (OPN), la cual es una glicoproteína ácida altamente fosforilada que se encuentra en los huesos, dientes y en sitios de calcificación patológica. Esta proteína posee alta afinidad por el calcio, principalmente cuando la proteína ha sufrido modificaciones postraduccionales (fosforilaciones), lo que le brinda una mayor capacidad de inhibir la formación de cristales de calcio.²¹⁻²²

La osteocalcina (OC) por otro lado, es una proteína que posee residuos de ácido glutámico carboxilados que le brindan la capacidad de inhibir el crecimiento de los cristales. La actividad biológica de la OC puede variar en función del alcance de las modificaciones post-traduccionales (misma observación reportada con la OPN) que, al cambiar la conformación de la proteína, pueden alterar la afinidad con los iones de calcio y con la hidroxiapatita.²³

La problemática actual de estas investigaciones, es la heterogeneidad de los estudios realizados con las diferentes proteínas, debido a que el estudio de dosis de intervención-efecto no ha determinado resultados relevantes, como es el caso de la BMP-7 y OC. Sin embargo, esta gran variedad de moléculas peptídicas reportadas podría aclarar el panorama acerca de cuáles podrían ser las características que deben presentarse para tener un efecto inhibitor. Y también, amplía más el campo de estudio, debido a que existen diversos mecanismos de interacción durante el proceso de mineralización ectópica que plantean más incógnitas sobre el empleo de proteínas o péptidos.

2.4 Mecanismos de interacción de factores inhibidores (dominios y residuos aminoacídicos).

Los inhibidores pueden actuar bajo diferentes mecanismos, cumpliendo ciertas características fisicoquímicas y estructurales. Se ha identificado un dominio funcional derivado de la glicoproteína extracelular de la matriz extracelular (MEPE) con la capacidad de inhibir la formación de minerales tanto *in vitro* como *in vivo*; dicho motivo es rico en residuos de serina y aspartato (ASARM).²⁴



Este dominio se ha encontrado como parte de una familia de proteínas glicosiladas denominadas SIBLINGS (por sus siglas en inglés), que incluyen a la proteína de la matriz de la dentina 1 (DMP1), la sialoproteína ósea (BSP), MEPE y OPN. Además, la proteína MEPE inhibe la mineralización de la matriz extracelular en cultivos de osteoblastos y células estromales de la médula ósea, donde se demostró que la unión del dominio ASARM a los cristales minerales depende de la fosforilación de los residuos de serina.^{25, 26, 27} Por tanto, la presencia de residuos ácidos como aspartato y glutamato, así como serinas y treoninas, proporcionan una carga negativa a proteínas y péptidos, brindándoles la capacidad de unirse a minerales e inhibir la formación y crecimiento de cristales.²⁴

2.4.1 Modificaciones postraduccionales.

Actualmente se sabe que las modificaciones post-traduccionales, concretamente fosforilaciones y glicosilaciones, potencializan la capacidad inhibitoria en proteínas y péptidos. Se ha demostrado que la presencia de residuos fosforilados aumentan la carga negativa de la molécula al disminuir su punto isoeléctrico en un pH fisiológico, lo que favorece su interacción con el calcio dentro de la red cristalina y estabilizar los núcleos nacientes o adsorbiéndose a las superficies de crecimiento cristalino.²⁹⁻³¹

Incluso, la fosforilación puede alterar la conformación de la red de proteínas, el comportamiento mecánico de la matriz orgánica y, en consecuencia, la dureza estructural del tejido mineralizado. Además, se ha demostrado que la adhesión de los osteoclastos aumenta con la fosforilación, por lo que se correlaciona con el grado de resorción ósea.²⁸⁻³² Estudios *in vitro*, empleando péptidos fosforilados demostraron que estas secuencias aminoácidas tienen la capacidad de inhibir la osteogénesis ya que son capaces de secuestrar los iones de calcio que se requieren para la formación de matriz mineralizante.²⁸⁻³² En la literatura, existe una gran variedad y heterogeneidad de estudios publicados que evidencian el papel modulador de diferentes proteínas en el proceso de mineralización; así mismo, estas biomoléculas polipeptídicas poseen propiedades fisicoquímicas que les permite actuar como posibles agentes terapéuticos de calcificaciones ectópicas.



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a las frecuentes complicaciones clínicas relacionadas con la calcificación vascular, comúnmente asociadas con la edad y enfermedades metabólicas (como la enfermedad renal crónica, diabetes, aterosclerosis, entre otros), existe una demanda continua de enfoques terapéuticos efectivos y seguros dirigidos a las calcificaciones ectópicas. Se han realizado una gran diversidad de estudios para conocer las vías patogénicas de la calcificación ectópica con el objetivo de identificar posibles objetivos farmacológicos.

Si bien, se han identificado moléculas con un gran potencial en inhibir la mineralización, aún no están bien descritos los mecanismos de acción de dichas moléculas, además de la existencia de datos controversiales. Por lo que existe la incertidumbre acerca de cuáles son las características fisicoquímicas que podrían tener en común las diferentes proteínas y péptidos con actividad inhibitoria de la mineralización. Descifrar este enigma ayudaría a dilucidar los posibles mecanismos de interacción de factores inhibidores biológicos en el proceso de crecimiento y maduración de calcificaciones ectópicas.

4. JUSTIFICACION

En este trabajo, nos enfocamos en realizar una búsqueda objetiva de estudios experimentales acerca del papel de diferentes proteínas y péptidos en la inhibición de la mineralización, permitiendo evaluar y comparar los diferentes resultados reportados de manera crítica con el fin de aportar información relevante al campo de estudio de los inhibidores biológicos.

Para lograr los objetivos se eligió el modelo de revisión sistemática, con el fin de generar resultados con la mejor calidad de evidencia, permitiéndonos exponer de manera exhaustiva y actualizada la información disponible de los factores inhibitorios para la consulta pública y futuros diseños de investigación terapéutica.



5. HIPÓTESIS

La secuencia aminoacídica, propiedades fisicoquímicas específicas y la presencia de modificaciones postraduccionales en proteínas y péptidos predicen la capacidad de actuar como factores inhibidores de la mineralización en diferentes entornos experimentales.

6. OBJETIVO GENERAL

Analizar la eficacia de proteínas y péptidos empleadas para inhibir el proceso de mineralización, bajo el análisis de estudios reportados en entornos *in vitro* e *in vivo*.

6.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Examinar las características fisicoquímicas de proteínas y péptidos con resultados positivos en la inhibición de la mineralización.
2. Comparar resultados reportados acerca del papel de diferentes proteínas y péptidos inhibidores en el proceso de la mineralización.
3. Aportar información al campo de estudio de los inhibidores de la mineralización para establecer bases en el desarrollo de enfoques terapéuticos.

7. METODOLOGIA DE LA REVISIÓN SISTEMÁTICA

La pregunta focalizada del estudio se planteó en formato PICO en su variante PIO (Población, Intervención y Resultado):

P: Estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*.

I: Proteínas y/o péptidos.

O: Inhibición de la mineralización.

“¿Cuál es el efecto del empleo proteínas y péptidos inhibidores en el proceso de mineralización reportados en estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*?”.



7.1 Criterios de selección de estudios.

7.1.1 Tipos de estudios:

Estudios experimentales en entornos *in vitro* e *in vivo*.

7.1.2 Tipos de participantes:

7.1.2.1 Estudios *in vitro*.

- ✓ Células humanas mineralizantes (osteoblastos, cementoblastos), células del músculo liso vascular (VSMC) y células troncales mesenquimales (MSC).

Células cultivadas en un entorno mineralizante para eliminar posibles variables en el análisis de resultados de diferentes estudios; además, para inducción a un fenotipo mineralizante en cultivos de VSMC y MSC.

- ✓ Cristales de fosfato de calcio.

Los depósitos cristalinos para ser analizables debieron ser preformados en condiciones fisiológicas (pH 7-7.4, temperatura 37°C) y caracterizados para determinar la fase cristalina que se estudió.

7.1.2.2 Estudios *in vivo*.

- ✓ Modelos animales con inducción patológica de formaciones de calcificaciones ectópicas sin criterios de lugar de aparición.

* Para considerar la presencia de calcificaciones (sin restricción de fase mineral) en modelo animal, el estudio debió corroborar el lugar ectópico donde se determinó la aparición.



7.1.3 Tipos de intervenciones.

- Empleo de proteínas y/o péptidos bioactivos en el tratamiento inhibitorio de la mineralización en entornos *in vitro* e *in vivo*.
- Empleo de proteínas y/o péptidos con modificaciones post-traduccionales en el tratamiento inhibitorio de la mineralización *in vitro* e *in vivo*.
- Intervenciones experimentales sin empleo de un tratamiento control* se evaluarán a lectura de texto completo.

* Un tratamiento control puede ser considerado como negativo, si fue una intervención nula de inhibidores (solo condiciones estándar); mientras que un tratamiento control positivo es tomado en cuenta con el empleo de moléculas no peptídicas (ej. pirofosfato).

- Evaluaciones de diferentes concentraciones de proteína/péptido.

7.1.4 Tipos de medidas de desenlace:

7.1.4.1 Desenlaces primarios.

1. Inhibición significativa en la formación de cristales de fosfato de calcio en entornos *in vitro* e *in vivo*.

7.1.4.2 Desenlaces secundarios.

1. Características fisicoquímicas de las proteínas/péptidos que mostraron resultados positivos o negativos en la inhibición de la mineralización.
2. Morfología y fase mineral de los cristales de fosfato de calcio preformados en interacción con las proteínas y/o péptidos.
3. Toxicidad o disminución en el número de las células con el empleo de proteínas/péptidos.
4. Ningún efecto o efecto no significativo.



7.2 Métodos de búsqueda para la identificación de estudios.

7.2.1 Estrategias de búsqueda.

La estrategia de búsqueda se ajustó de acuerdo a los criterios de PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses, por sus siglas en inglés). La búsqueda bibliográfica se completó en mayo, 2021 por dos revisores (AMC y GMA) en 3 base de datos: PubMed/MEDLINE, LILACS (Portal de acceso BVS) y SCOPUS (Portal de acceso Bidi UNAM).

Como parte de la búsqueda manual, se utilizaron los siguientes términos MeSH para estandarizar de manera primaria la búsqueda de artículos: “Calcium-Binding Proteins”, “Inhibitory peptides” y “Mineralization, inhibition”.

Con base en la búsqueda en PubMed, se analizaron términos relacionados con los primarios que estén presentes en la estructura del árbol MeSH y tengan relación con los objetivos de la revisión, con el fin de diseñar algoritmos de búsqueda más específicos y facilitar la obtención de los primeros artículos.

No se aplicaron restricciones en fechas de publicación ni de idioma. Todos los estudios se importaron por título para el análisis y eliminación de artículos duplicados, siendo el primer corte de estudios.

7.2.2 Selección de los estudios.

Dos revisores (AMC y GMA) evaluaron de forma independiente la elegibilidad de los estudios para su exclusión bajo la lectura de “Títulos” y “Resumen”.

El criterio de elegibilidad para la inclusión de artículos fueron los siguientes:

- Estudios que evaluaron el uso de proteínas/péptidos inhibidores de la mineralización en entornos *in vitro* e *in vivo*.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Artículos de revisión (Reviews, Overviews), protocolos o estudios piloto.



Cualquier desacuerdo se resolvería consultando a un tercer revisor. Se realizó la comparación de los primeros datos recopilados entre los dos revisores y se resolvieron diferencias en la inclusión o exclusión de artículos. Cualquier desacuerdo sobre la inclusión de estudios se resolvería mediante discusión y consenso o por un tercer revisor.

Además, se realizó una búsqueda cruzada de artículos con base a las referencias de artículos seleccionados para la lectura completa. Esta búsqueda cruzada es necesaria para añadir artículos que no se encontraron manualmente con la búsqueda en bases de datos. Al obtener el segundo corte en común acuerdo entre los revisores, se prosiguió a la evaluación del texto completo de forma independiente y por duplicado.

7.3 Extracción y análisis de los datos.

Dos revisores extrajeron los datos por separado, se compararon y resolvieron las diferencias por consenso. Cualquier desacuerdo se resolvería consultando al tercer autor de la revisión.

7.3.1 Evaluación de calidad de estudio.

- Estudios *in vitro*. La calidad del estudio se evaluó con base en la herramienta de riesgo de sesgo Risk of Bias 2 (RoB 2) en su versión corta (CRIBSHEET) adaptándola a un carácter de estudio no aleatorio.

- Estudios *in vivo*. La calidad metodológica se evaluó con base en la herramienta de riesgo de sesgo SYRCLE para estudios con animales.

7.3.2 Análisis de evaluación de calidad.

Cada componente de evaluación se calificó como “bajo”, “poco claro” o “alto” riesgo de sesgo mediante el software RevMan® versión 5.4 (Review Manager, The Cochrane Collaboration).



7.3.3 Datos a extraer.

A partir de los estudios que se incluyeron a la revisión, se colocaron en orden cronológico (del estudio más reciente al más antiguo publicado) y se obtuvieron los siguientes datos para elaborar las tablas de resumen:

- Proteína o péptido empleado / entorno de estudio (*in vitro* o *in vivo*) / Referencia del estudio (autor principal / año de publicación).

- Descripción de población:

- * *In vitro*: Población celular estudiada (con medio de cultivo) o fase mineral de cristales (con método de cristalización).

- * *In vivo*: Modelo Animal estudiado (con método de inducción de calcificaciones).

- Descripción de Intervención (dosis, tiempo de intervención y descripción del modelo de estudio (*in vivo*)).

- Resultados reportados.

7.3.4 Generación de la evidencia.

La descripción y análisis de los datos fue de manera cualitativa, con el fin de resumir y comparar los parámetros de intervención y resultado reportados durante la evaluación. No se realizó metaanálisis debido al objetivo de incluir estudios *in vitro* e *in vivo*; y por el enfoque de búsqueda seleccionado, se previó que se obtendrían datos heterogéneos con la revisión.



8. RESULTADOS

8.1 Estrategia de búsqueda y selección de estudios.

Con el planteamiento de los términos MeSH para la búsqueda inicial, se analizó la estructura de árbol MeSH en el portal de acceso PubMed, para determinar de manera más específica los términos a buscar acorde a los criterios de inclusión. Se obtuvieron 1066 artículos potencialmente relevantes en las bases de datos MEDLINE, LILACS y SCOPUS (**FIG 3**).

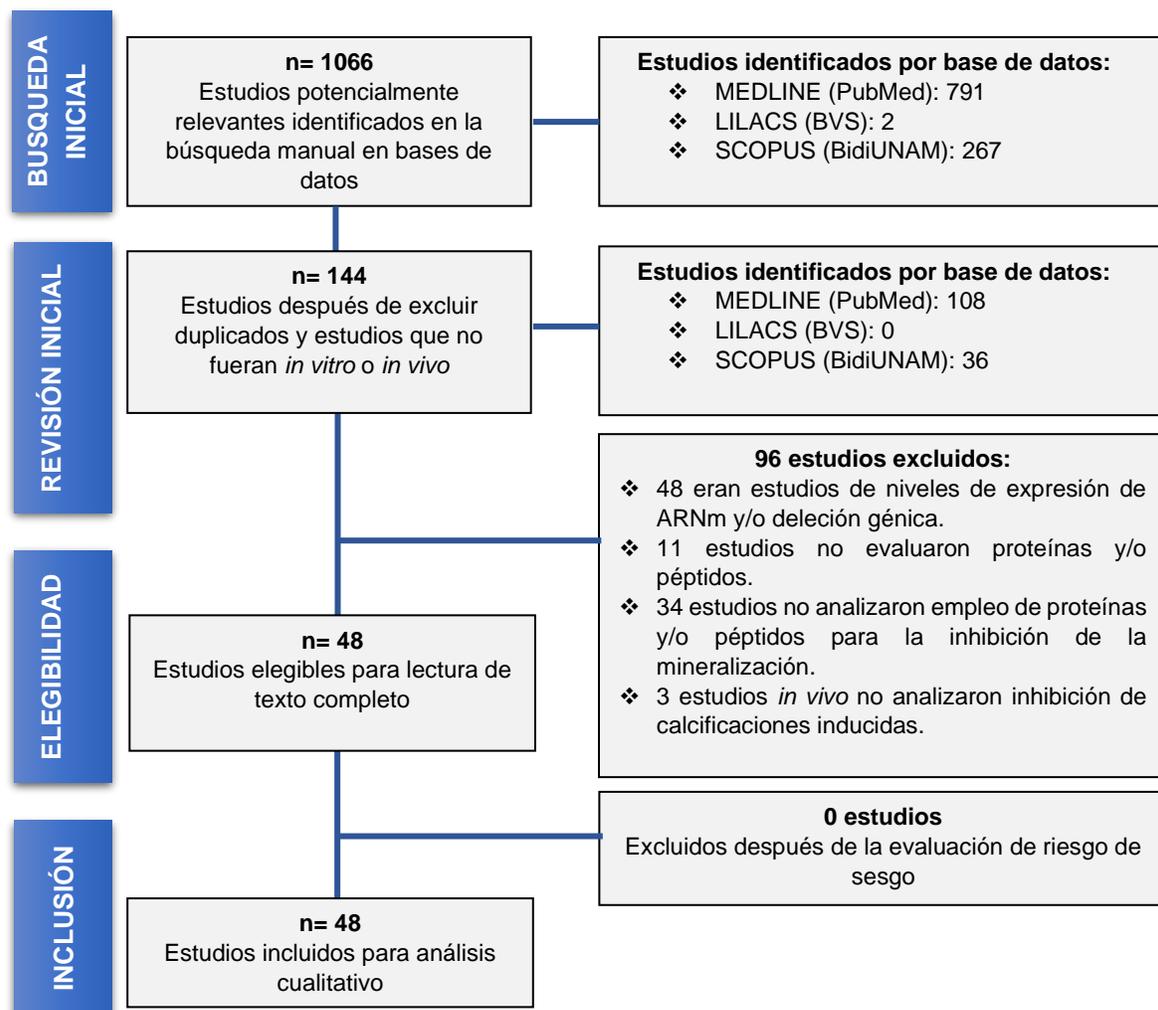


FIG 3. Diagrama de flujo con la descripción de la estrategia de búsqueda, revisión e inclusión de artículos (como se describe en los estatus de PRISMA).



Tras la revisión inicial de título, resumen, la exclusión de duplicados y estudios no experimentales (reviews, protocolos de investigación, cartas al editor) se obtuvieron 144 documentos para continuar con la lectura de texto completo, etapa donde se excluyeron 96 estudios.

Dichos estudios no se pudieron incluir debido a que no cumplían con los criterios planteados, 48 eran estudios de niveles de expresión de ARNm y/o deleción génica, 11 no evaluaron proteínas y/o péptidos, 34 no analizaron inhibición de la mineralización y 3 estudios *in vivo* no analizaron inhibición de calcificaciones inducidas.

8.2 Descripción de estudios.

Un total de 48 artículos cumplieron todos los criterios de selección y se incluyeron para el análisis cualitativo (**Tabla II**). Los estudios se llevaron a cabo en diferentes países, con el mayor número de estudios en Canadá (17), Estados Unidos (17) y China (6).

Se obtuvieron 44 estudios específicos en entorno *in vitro* y 2 en entorno *in vivo*; destacando la obtención de 2 artículos (*Chen et al.*⁴⁰, *Cai et al.*⁵³) donde se realizaron ensayos en ambos entornos.

En los 4 estudios *in vivo* (*Chen et al.*⁴⁰, *Wang et al.*⁴⁹, *Cai et al.*⁵³, *Ohri et al.*⁶¹) se utilizaron como modelo animal ratas Sprague-Dawley. En el caso de los 46 estudios *in vitro*, en 22 se realizaron análisis cristalino de diferentes fases minerales, en 22 se realizaron cultivos celulares, principalmente con células troncales mesenquimales y células similares a osteoblastos, además de 2 estudios (*Hoac et al.*³⁶, *Addison et al.*⁵⁶) donde se emplearon ambas metodologías.

TABLA II. Tabla de resumen con la extracción de datos de los estudios incluidos.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Péptido CAP-pi y CAP-pip (fosforilado) <i>In vitro</i></p> <p>Montoya et al. 2020³³</p>	<p>Cristalización de depósitos de hidroxiapatita (HA) por ensayo de precipitación de soluciones iónicas.</p> <hr/> <p>Crecimiento de cristales semilla de HA (2 mg) por ensayo de composición constante.</p> <hr/> <p>Cristalización de Oxalato de calcio (OxC) por ensayo de precipitación de soluciones iónicas.</p>	<p>Empleo de péptidos CAP-pi y CAP-pip (0-10 µg/ml) en ambos ensayos de cristalización y crecimiento de HA por 4 hrs.</p> <hr/> <p>Empleo de péptidos CAP-pi y CAP-pip (0.5 y 1.0 µg/ml) en solución de oxalato de calcio por 30 min.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - CAP-pi (0.5-5 µg/ml) inhibió significativamente el crecimiento de HA. - CAP-pip (5 µg/ml) mostro el potencial más alto de inhibición en la cristalización y crecimiento de HA. - CAP-pi (0.5.1 µg/ml) provocó cambios morfológicos en los cristales, pero presento un efecto inhibitorio poco significativo en la cristalización del OxC. - CAP-pip (0,5 y 1 µg/ml) provoco cambios morfológicos significativos en los cristales, con cristales más pequeños y estructura característica del OxC dihidratado. - CAP-pip se adsorbió rápidamente en las caras cristalinas {1-2-1} y {1-0-0} del OxC.
<p>Proteína Osteoprotegerina (OPG) <i>In vitro</i></p> <p>Zhang et al. 2019³⁴</p>	<p>Cultivo de células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea de ratas Sprague-Dawley en un medio osteoinductor</p>	<p>Empleo de la proteína de fusión OPG-Fc libre (5, 50 y 500 ng/ml) u OPG-Fc acoplada en válvulas aórticas descelularizadas en el día 1 de cultivo por 10 días</p>	<ul style="list-style-type: none"> - OPG-Fc libre (500 ng/ml) inhibió significativamente la diferenciación osteogénica de las células. - OPG-Fc libre (5-500 ng/ml) inhibió significativamente el contenido de calcio en cultivo y la actividad de ALP dependiente de dosis en el día 7 de cultivo. - OPG-Fc libre (500 ng/ml) en el día 7 de cultivo disminuyo significativamente los niveles de expresión de ARNm de BMP-2, OPN y OC.
<p>Péptido FTI-277 (Inhibidor de farnesil transferasa) <i>In vitro</i></p> <p>Ponnusamy et al. 2018³⁵</p>	<p>Cultivo de células de musculo liso vascular aisladas de explantes aórticos bovinos en un medio osteoinductor</p>	<p>Empleo de FTI-277 (1–20 µM), manumycin A (10 y 20 µM), SH6 (10 µM) o combinados en el día 1 de cultivo por 12 días</p>	<ul style="list-style-type: none"> - FTI-277 (10-20 µM) inhibió significativamente la deposición mineral entre los días de cultivo 1-6. - FTI-277 (20 µM) inhibió significativamente la diferenciación osteogénica de las células. - FTI-277 (20 µM) aumentó significativamente los niveles de expresión de ARNm de otro inhibidor, la proteína gla de la matriz (MGP). - Otros grupos experimentales estudiados y el grupo control no mostraron resultados significativos de inhibición de la deposición mineral.

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i></p> <p><i>Hoac et al. 2017</i>³⁶</p>	<p>Cristalización de depósitos de hidroxiapatita (HA) por ensayo de precipitación de soluciones iónicas.</p> <hr/> <p>Cultivo de células similares a osteoblastos MC3T3-E1 en un medio mineralizante</p>	<p>Empleo de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - OPN polimérica (0-1000 µg/ml) (OPN de leche bovina y reticulada por transglutaminasa 2 (TG2)) - OPN polimérica fosforilada (0-700 µg/ml) en soluciones de cristalización de HA por 48 hrs <p>y</p> <p>OPN de leche bovina y OPN polimérica (+TG2) (0-67.5 µg/ml) en los días de cultivo 1, 3, 6, 9 y 12 días.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - OPN fosforilada (700 µg/ml) inhibió al 100% el crecimiento de HA. - OPN polimérica (>840 µg/ml) inhibió al 100% el crecimiento de HA - Tanto OPN fosforilada como OPN polimérica presentaron efecto inhibitor significativo a partir de concentraciones >63 µg/ml. <hr/> <ul style="list-style-type: none"> - OPN polimérica tuvo un efecto inhibitor significativo en la deposición de calcio dependiente de dosis sólo cuando se emplea de forma continua en días 1-12 de cultivo. - OPN bovina tuvo efecto inhibitor en la deposición de calcio dependiente de dosis tanto en días 1-6 como 1-12 de cultivo.
<p>Factor de crecimiento fibroblástico (FGF) <i>In vitro</i></p> <p><i>Cao et al. 2017</i>³⁷</p>	<p>Cultivo de células de músculo liso vascular aisladas de aorta de ratas Sprague-Dawley en un medio osteoinductor</p>	<p>Empleo de FGF-21 (0-50 ng/ml) entre los días 3-9 de cultivo</p>	<ul style="list-style-type: none"> - FGF-21 (50 ng/ml) disminuyó la deposición de calcio dependiente del día de cultivo empleado (resultados más significativos obtenidos en el día 3). - FGF-21 (50 ng/ml) disminuyó significativamente los niveles de expresión de ARNm de BMP-2, ALP y RUNX2. - FGF-21 (50 ng/ml) aumentó de manera significativa el nivel de expresión de ARNm de OPG. - Se demostró que la función de FGF-21 es dependiente del sistema OPG/RANKL y su expresión.
<p>Proteína Estaterina <i>In vitro</i></p> <p><i>Xiao et al. 2015</i>³⁸</p>	<p>Cristalización de depósitos de hidroxiapatita (HA) por ensayo de microtitulación de soluciones iónicas</p>	<p>Empleo de estaterina (0-9 µM) y 6 péptidos derivados (0.9-9 µM) en soluciones de cristalización de HA por 1 hr.</p> <p>1 péptido derivado (DR9) estaba fosforilado en sus residuos 2 y 3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Estaterina inhibió significativamente la cristalización de HA dependiente de la dosis. - Péptido fosforilado DR9 (2.7-9 µM) inhibió significativamente la cristalización de HA - Los 5 péptidos restantes no presentaron efecto inhibitor significativo. - Simulaciones de dinámica molecular mostraron que el péptido fosforilado tenía una fuerte afinidad y rápida adsorción (después de 5 ns) a la HA.

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Péptido VTK <i>In vitro</i> <i>Ramaswamy et al. 2015</i>³⁹</p>	<p>Cultivo de células similares a osteoblastos murinos MC3T3-E1 en medio mineralizante</p>	<p>Empleo del péptido VTK (0 y 300 µM) en periodos de día 1-6, 1-12 y 7-12 de cultivo</p>	<p>- VTK (300 µM) impidió la progresión de la mineralización una vez iniciada, al presentar un efecto inhibitorio al 100% al emplearlo en los días 1-12 y 7-12 de cultivo. - VTK (300 µM) empleado en los días 1-6 de cultivo disminuyó en una menor medida la progresión de la mineralización. -VTK (300 µM) aumentó significativamente los niveles de expresión de ARNm de Runx2 y BSP, mientras que los niveles de OPN, Pit-1 y Ank disminuyeron.</p>
<p>Péptido natriurético tipo C (CNP) <i>In vitro</i> <i>In vivo</i> <i>Chen et al. 2014</i>⁴⁰</p>	<p>Cultivos de células de músculo liso vascular aisladas de aorta de ratas Sprague-Dawley en un medio mineralizante por método de explantes.</p> <hr/> <p>Modelo animal Ratas macho Sprague-Dawley (n =17) con inducción de calcificaciones vasculares (CV) en aorta por vitamina D3 más nicotina.</p>	<p>Empleo del péptido CNP (10⁻⁹ y 10⁻⁷ mol/L) en el cultivo de VSMC diferenciadas en el día 1 de cultivo por 4 días</p> <hr/> <p>Las ratas fueron divididas aleatoriamente en 3 grupos: - Grupo CV inducido - Grupo CV + CNP (n=8): se administró CNP humana (500 ng/kg/h) 24 hrs después de la inducción de CV por vía subcutánea mediante una mini bomba osmótica. - Grupo control (n=8), solo disolventes de vehículo.</p>	<p>- CNP (10⁻⁹ mol/L) disminuyó significativamente la deposición de calcio en un 53% y la actividad de ALP en un 40%. - CNP (10⁻⁷ mol/L) disminuyó significativamente la deposición de calcio en un 36% y 58 % actividad de ALP.</p> <hr/> <p>- Administración de CNP disminuyó en un 8% el LVW/BW (peso del ventrículo izquierdo/peso corporal) y la presión arterial sistólica en un 6%. - CNP disminuyó la deposición de calcio y la actividad de ALP en la aorta en un 52% y un 39 % respectivamente. -Administración de CNP redujo significativamente las calcificaciones en las aortas en comparación con los controles. - CNP disminuyó significativamente los niveles de expresión de ARNm de BMP-2 (73%) y OPN (45%).</p>
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i> de Bruyn <i>et al. 2013</i>⁴¹</p>	<p>Cristalización de depósitos de hidroxiapatita (HA) por ensayo de precipitación de soluciones iónicas.</p>	<p>Empleo de 3 isoformas de OPN: - OPN nativa extraída de hueso de rata (1-4 µg/ml) - OPN fosforilada (1.5-8 µg/ml) - OPN recombinante de rata (0.5-6 µg/ml)</p>	<p>- OPN nativa (1 µg/ml) causó retraso en el inicio de la precipitación y disminuyó significativamente el número de depósitos de HA. - OPN fosforilada causó un efecto en los depósitos de HA similar al de OPN nativa, pero a concentraciones más altas (6 y 8 µg/ml). - OPN recombinante (> 1 µg/ml), no causó efecto significativo en la precipitación inicial de HA, pero ralentizó significativamente el crecimiento de los cristales.</p>

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Activina A <i>In vitro</i></p> <p><i>Alves et al. 2013</i> ⁴²</p>	<p>Cultivos de células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea humana en medio osteoinductor</p>	<p>Empleo de activina A (0-25 ng/ml) en el día 1 de cultivo por 17 días</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Activina A (25 ng/ml) disminuyó la actividad de ALP1 (>75%) en cultivo. - Activina A (25 ng/ml) provocó una producción deficiente de vesículas de la matriz por parte de las células diferenciadas. - Activina A (25 ng/ml) disminuyó significativamente la deposición de calcio entre los días 10-12 de cultivo, teniendo un efecto inhibitorio en la mineralización de la matriz extracelular en los cultivos.
<p>Proteína Gla de la matriz (MGP) <i>In vitro</i></p> <p><i>Goiko et al. 2013</i> ⁴³</p>	<p>Cristalización de depósitos de hidroxiapatita (HA) y oxalato de calcio por ensayo de precipitación de soluciones iónicas</p>	<p>Empleo de 6 péptidos (14 aminoácidos c/u) derivados de MGP: 3 péptidos γ-carboxilados, 1 péptido fosforilado y 1 péptido con ambas modificaciones postraduccionales.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Para el ensayo de HA, se empleó concentraciones de 0-10 μg/ml. - Para el ensayo de OxC, se empleó concentraciones de 0-20 μg/ml. 	<ul style="list-style-type: none"> - Péptido γ-carboxilado y fosforilado (YGlaps) (3 μg/ml) inhibió significativamente tanto la nucleación como en el crecimiento de los depósitos de HA comparado con los otros 5 péptidos estudiados. - Los fosfopéptidos YGlaps (5 μg/ml) y YEpS (20 μg/ml) mostraron mejor eficacia como inhibidores, al disminuir la formación de depósitos de oxalato de calcio dihidratado.
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i></p> <p><i>Boskey et al. 2012</i> ⁴⁴</p>	<p>Cristalización de depósitos de HA por ensayo de precipitación en gel de soluciones de fosfato de calcio amorfo y con el sistema pH-stat</p>	<p>Se empleó OPN de leche bovina (OPNm) (0-8 μM) y 3 fragmentos (0-8 μM) en el ensayo: un fragmento N-terminal, un fragmento central (SKK) y un fragmento C-terminal. Por 20 minutos</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Fragmento SKK (1 μM) mostro mejor eficacia en la inhibición en la formación y crecimiento de HA en el sistema pH-stat y en gel. - Fragmento SKK (1-8 μM)) mostro mayor número de sitios de unión específicos a la HA. - SKK y OPNm mostraron no tener una afinidad significativa por colágena tipo I.
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i></p> <p><i>Chan et al. 2012</i> ⁴⁵</p>	<p>Cristalización de depósitos de oxalato de calcio monohidratado (OCM) y dihidratado (OCD) por ensayo de precipitación de soluciones iónicas</p>	<p>Empleo de 7 péptidos derivados de OPN murina (0-20 μg/ml) en soluciones de cristalización de OCM y OCD por 30 min. 3 péptidos estaban fosforilados.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Los 3 péptidos fosforilados (2-20 μg/ml) inhibieron significativamente la cristalización de OCM. - Determinaron que a mayores concentraciones de péptidos fosforilados o con grupos carboxilatos contiguos en su secuencia, inhibían la formación de OCM. - Los péptidos fosforilados y que contenían grupos carboxilatos en su secuencia promovieron significativamente la formación de OCD.

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Péptido poli(ácido l-glutámico) <i>In vitro</i></p> <p>Grohe et al. 2012 ⁴⁶</p>	<p>Cristalización de depósitos de oxalato de calcio monohidratado (OCM) por ensayo de precipitación de soluciones iónicas</p>	<p>Empleo del péptido poli-glu (0, 1 y 6 µg/ml) en soluciones de cristalización de OCM por 30 min.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Péptido poli-glu a bajas concentraciones (1 µg/mL) inhibió significativamente el número y crecimiento de cristales de OCM. - Péptido poli-glu a altas concentraciones (6 µg/mL) dio lugar a la formación de pocos cristales pequeños con una morfología cóncava con "forma de campana". - Se determinó que el péptido poli-glu (6 µg/mL) interactúa con mayor afinidad con la cara cristalina {100} del OCM, inhibiendo en esa dirección con mayor eficacia el crecimiento cristalino.
<p>Proteína Gla de la matriz (MGP) <i>In vitro</i></p> <p>O'Young et al. 2011 ⁴⁷</p>	<p>Crecimiento de cristales semilla de HA (2 mg) por ensayo de composición constante</p>	<p>Empleo de 11 péptidos (0-20 µg/mL) derivados de MGP humana en solución por periodos de incubación de 20-240 min:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 6 péptidos nativos cubrían toda la secuencia de MGP. - 5 péptidos fueron modificados (2 fueron desfosforilados y 3 des-γ-carboxilados). 	<ul style="list-style-type: none"> - Péptido YGlapS (contiene grupos fosfato y residuos gla) (2,96-14 µg/mL) fue el inhibidor más potente al tener un efecto total en el crecimiento de HA. - Otros 5 péptidos nativos mostraron un efecto inhibitor con mínima eficacia y a altas concentraciones. - Péptidos desfosforilados no presentaron resultados significativos de inhibición. - Se determinó que el efecto inhibitor en el crecimiento de HA es más eficaz con modificaciones como la fosforilación, - Se determinó que la γ-carboxilación no influye en el potencial inhibitor de los péptidos.
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i></p> <p>Grohe et al. 2011 ⁴⁸</p>	<p>Cristalización de depósitos de oxalato de calcio monohidratado (OCM) por ensayo precipitación de soluciones iónicas con orina humana ultrafiltrada</p>	<p>Empleo en soluciones de cristalización por 3 hrs de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - OPN renal humana (0-50 µg/ml) (contenía 7 grupos carboxilatos y 8 fosfatos). - 3 péptidos nativos derivados de OPN ósea de rata (0-90 µg/ml). - Un péptido derivado de OPN desfosforilado (0-90 µg/ml). 	<ul style="list-style-type: none"> - Péptido fosforilado pOPAR y OPN humana (0,5-5 µg/ml) inhibieron significativamente la formación de OCM, alterando la morfología cristalina y promoviendo la formación de oxalato de calcio dihidratado (OCD). - Péptido derivado OPAR provocó un efecto similar al péptido fosforilado pero a altas concentraciones (2-30 µg/ml). - El análisis comparativo de los péptidos empleados demostró que los grupos carboxilato desempeñan un papel en la inhibición de la formación de OCM, mientras los grupos fosfato y carboxilato en conjunto promueven la formación de OCD.

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Péptido Ghrelina <i>In vivo</i> <i>Wang et al. 2011</i>⁴⁹</p>	<p>Modelo animal Ratas macho Sprague-Dawley (n= 36) con calcificaciones inducidas en miocardio por nicotina (25 mg/kg) y vitamina D3 (300,000 IU/kg) administrada vía intramuscular</p>	<p>Ratas se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (n=9 para cada grupo): - Grupo control (solución salina). - Grupo nicotina+vitamina D3 (NVD). - Grupo 1 NVD + Ghrelina (1 nmol/kg/día) - Grupo 2 NVD + Ghrelina (10 nmol/kg/día) Administración del péptido ghrelina fue por inyección vía subcutánea por 4 semanas</p>	<p>- La administración de ghrelina disminuyó significativamente los niveles de calcio en miocardio (grupo 1 bajo un 13% y grupo 2 un 28%) en comparación con el grupo NVD. - Disminuyo la actividad significativamente de ALP en miocardio y plasma dependiente de la dosis de ghrelina (grupo 1 bajo un 18% y grupo 2 un 27%). - Aumentó el nivel de expresión de ARNm de OPN más de 3 veces en los 2 grupos de ghrelina comparado con el grupo NVD . Disminuyo aprox. 60-80% el nivel de expresión de ARNm de Endotelina-1 dependiente de la dosis.</p>
<p>Proteína Esclerostina (SCL) <i>In vitro</i> <i>Atkins et al. 2011</i>⁵⁰</p>	<p>Cultivo de células similares a osteoblastos primarios aislados de hueso humano en medio mineralizante</p>	<p>Empleo de: - Esclerostina recombinante humana (1, 10 y 50 ng/ml). - Péptido trifosforilado ASARM derivado de MEPE humano (1, 10 y 20 µM). - Péptido SPR4 que representa la región de unión de PHEX humana (10 µM) En el día 1 de cultivo por 35 días, empleado en diferentes periodos de tiempo.</p>	<p>- SCL disminuyo significativamente la incorporación de calcio en los cultivos celulares de manera dependiente de la dosis. - SCL (50 ng/ml) aumento su efecto inhibitor de la deposición de calcio en cultivo al emplearla en los días 21 y 28. - SCL (10-50 ng/ml) aumentó los niveles de expresión de ARNm como de la concentración de la fosfoglicoproteína MEPE. - Péptido ASARM (10-20 µM) inhibió un 100% la deposición de calcio tras su empleo de 28 días en cultivo. - Se demostró que SCL actúa a través de la regulación del eje PHEX/MEPE en el estadio de precursores celulares (pre-osteoblasto).</p>
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i> <i>Thurgoood et al. 2011</i>⁵¹</p>	<p>Depósitos de oxalato de calcio dihidratado (OCD) en un medio de orina ultrafiltrada e incubadas con células de riñón canino Madin Darby (MDCK)</p>	<p>Empleo de OPN de leche humana (en 3 alícuotas preparadas con 0, 1.0 y 5.0 mg/L), incubadas del día 2 a 10. Se estudio la OPN unida a la superficie cristalina y OPN intracristal.</p>	<p>- OPN (1-5 mg/L) unida a la superficie cristalina no mostro valores significativos de disminuir la resistencia de degradación de OCD a los 10 días de incubación. - OPN (1-5 mg/L) intracristal disminuyo significativamente la resistencia de disolución del OCD a los 10 días de incubación. - OPN (1-5 mg/L) intracristal empleada por 6 días provoco una alteración significativa en la morfología de OCD. - OPN (5 mg/L) disminuyo un 43% el tamaño de los cristales de OCD de forma dependiente de la dosis.</p>

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
Fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE) y péptido derivado ASARM <i>In vitro</i> <i>Boskey et al. 2010</i> ⁵²	<p>Crecimiento de cristales semilla de HA (2 mg) por ensayo con un sistema dinámico de difusión iónica en gel</p>	<p>Empleo en el sistema de difusión por 3.5 y 5 días de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Proteína MEPE (0–50 µg/ml). - Proteína MEPE desfosforilada (0–50 µg/ml). - Péptido ASARM derivado de MEPE (fosforilado y no fosforilado) (0–50 µg/ml). 	<ul style="list-style-type: none"> - Péptido ASARM fosforilado inhibió significativamente el crecimiento de HA dependiente de la dosis; pero se perdió el efecto inhibitor con ASARM desfosforilado. - Proteína MEPE a bajas dosis (<25 µg/ml) actuó como promotor del crecimiento de HA, pero a altas dosis (>50 µg/ml) tuvo un efecto inhibitor significativo en HA. - Proteína MEPE desfosforilado no presento efecto significativo en el crecimiento de HA.
Péptido Intermedina (IMD) <i>In vitro</i> <i>In vivo</i> <i>Cai et al. 2010</i> ⁵³	<p>Cultivos de células de musculo liso vascular aisladas de aorta de ratas Sprague-Dawley en un medio osteoinductor</p> <hr/> <p>Modelo animal Ratas macho Sprague-Dawley (n =17) con calcificaciones vasculares (CV) inducidas por vitamina D3 (300 000 IU/kg) vía intramuscular y nicotina (25 mg/kg) vía intragástrica</p>	<p>Empleo del péptido IMD (10⁻⁷ y 10⁻⁸ mol/L) en el día 1 de cultivo por 7 días</p> <hr/> <p>Ratas se dividieron aleatoriamente en 3 grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Grupo control (n=10), solo disolventes de vehículo. - Grupo CV inducido. - Grupo CV + IMD (n=7): 100 ng/ kg⁻¹/h⁻¹ por vía subcutánea mediante una mini bomba osmótica 24 hrs después de la inducción de CV. Administración del péptido IMD por 4 semanas. 	<ul style="list-style-type: none"> - IMD (10⁻⁷ y 10⁻⁸ mol/L) inhibe significativamente la deposición de calcio y la actividad de ALP en los cultivos por medio de su efecto de aumentar los niveles de la proteína gla de la matriz en los cultivos. - IMD (10⁻⁷ mol/L) aumentó significativamente los niveles de expresión de ARNm de marcadores celulares del linaje del músculo liso. <hr/> <ul style="list-style-type: none"> - Grupos CV inducidos mostraron menor presencia de IMD intrínseco comparados con los grupos control. - Grupos CV inducidos presentaron un mayor depósito de calcio vascular así como una mayor actividad de ALP en plasma comparado con los grupos control. - Administración de IMD redujo significativamente (aprox. 80%) el depósito de calcio en comparación con los grupos CV inducidos. - IMD redujo aprox. 7 veces la actividad de ALP tisular y en plasma a comparación con los grupos CV inducidos.
Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i> <i>Silverman et al. 2010</i> ⁵⁴	<p>Cristalización de depósitos de HA por ensayo de precipitación de soluciones iónicas</p>	<p>Empleo de 3 péptidos con 6 aminoácidos c/u derivados de OPN en soluciones de cristalización por 2 hrs:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2 péptidos nativos (0-2 µmol/ml) con secuencias SDESDE y DDDDDD. - 1 péptido SDESDE fosforilado (0-2 µmol/ml). 	<ul style="list-style-type: none"> - Péptido fosforilado (>0,67 µmol/ml) fue el inhibidor más efectivo de crecimiento de HA. - Péptido nativo SDESDE no mostró ningún efecto en el crecimiento de HA. - Péptido nativo DDDDDD (0.68-1.4 µmol/ml) mostro un efecto moderado pero poco significativo en la inhibición del crecimiento de HA. - Análisis de adsorción por el modelado molecular mostro tendencias de energía de unión de los hexapéptidos principalmente a la cara cristalina [100] de HA.

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Péptido ASARM derivado de OPN <i>In vitro</i></p> <p><i>Addison et al. 2010</i>⁵⁵</p>	<p>Cultivo de células similares a osteoblastos MC3T3-E1 de calvaria murina en medio mineralizante</p>	<p>Empleo de 4 péptidos derivados del dominio ASARM de OPN humana en el día 1 de cultivo por 12 días:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 3 péptidos con 0 (OpnAs0), 3 (OpnAs3) y 5 (OpnAs5) fosfoserinas (0-20 µM). - 1 péptido nativo (control) (0-20 µM) - Empleo adicional de enzima PHEX (20 µg/ml) 	<ul style="list-style-type: none"> - Péptido OpnAs0 no mostró ninguna unión a HA y no tuvo algún efecto en la mineralización del cultivo. - Péptido OpnAs3 a altas concentraciones (20 µM) inhibió significativamente la deposición de calcio en cultivo. - Péptido OpnAs5 a bajas concentraciones (1 µM) fue el inhibidor más potente al disminuir al 100% la deposición de calcio. - Demostraron por análisis de modelado molecular que el número de fosforilaciones de los péptidos es determinante y proporcional a la unión con la HA. - Mostraron que la enzima PHEX puede modular selectivamente la actividad de los péptidos ASARM dependiente de la fosforilación, al solo tener efecto en el péptido de 3 fosfoserinas (OpnAs3) durante el proceso de mineralización.
<p>Péptido VTK <i>In vitro</i></p> <p><i>Addison et al. 2010</i>⁵⁶</p>	<p>4 discos de apatitas: - Apatita similar a hueso. - Hidroxiapatita. -2 tipos de apatita que contenían inicialmente 5.6% y 10.5% de carbonato.</p> <hr/> <p>Cultivo de células similares a osteoblastos MC3T3-E1 de calvaria murina en medio mineralizante</p>	<p>Empleo de 2 péptidos variantes de VTK (0-300 µM) en discos de apatitas por 18 hrs:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 péptido VTK nativo y 1 péptido VTK fosforilado. <p>Para el estudio en cultivos, se emplearon 4 variantes de VTK en el día 1 de cultivo por 12 días.:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2 péptidos VTK (nativo y fosforilado) (0-300 µM) - 2 variantes VTK con aminoácidos revueltos (0-300 µM). 	<ul style="list-style-type: none"> - Péptido VTK fosforilado (200-300 µM) se adsorbió 10 veces más a los discos con apatita similar a hueso, y 2 veces más a las apatitas carbonatadas, en comparación con el péptido nativo. - No hubo diferencias significativas en la adsorción de VTK y VTK fosforilado a la HA. - Péptido VTK fosforilado (200-300 µM) fue el único que mostro un efecto inhibitor del 100% en mineralización en el día 12 de cultivo. - Los péptidos variantes no tuvieron efecto inhibitor mayor a los péptidos VTK nativo y fosforilado, por lo que el orden de la secuencia de aminoácidos es crítico para la regulación de la mineralización <i>in vitro</i>.
<p>Proteína Adiponectina (AN) <i>In vitro</i></p> <p><i>Luo et al. 2009</i>⁵⁷</p>	<p>Cultivo de células de musculo liso vascular C57BL/6 aisladas de aorta murina deficientes de adiponectina en medio osteoinductor</p>	<p>Empleo de AN (0, 3, 10 y 30 µg/ml) en el día 4 de cultivo durante periodos de 5-60 minutos, 48 hrs y 20 días</p>	<ul style="list-style-type: none"> - AN (10-30 µg/ml) disminuyo significativamente la actividad de ALP tras 48 hrs de empleo en cultivo. - AN (10-30 µg/ml) disminuyo significativamente los niveles de expresión de ARNm de osteocalcina y Runx2 tras 48 hrs de empleo en cultivo. - AN (30 µg/ml) inhibió la formación de nódulos minerales en matriz celular tras 20 días de empleo en cultivo. - Tras el empleo de AN por 60 mins. en cultivo, se demostró que inhibió la diferenciación de VSMC a un linaje osteoblástico a través de la vía AdipoR1/ p38.

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i></p> <p><i>Langdon et al. 2009</i>⁵⁸</p>	<p>Cristalización de depósitos de oxalato de calcio monohidratado (OCM) por ensayo de precipitación de soluciones iónicas</p>	<p>Empleo de 3 isoformas de OPN en soluciones por 0-58 mins:</p> <ul style="list-style-type: none"> - OPN de leche bovina (OPNm), altamente fosforilada (0-10 µg/ml). - OPN de hueso de rata (OPNb), fosforilada en menor cantidad (0-10 µg/ml). - OPN recombinante (OPNr) desfosforilado (0-10 µg/ml). 	<ul style="list-style-type: none"> - Las 3 isoformas de OPN (10 µg/ml) provocaron una disminución significativa del tamaño de los depósitos de OCM. - OPNm (10 µg/ml) fue el más eficaz de las 3 isoformas, al disminuir 4 veces el tamaño de los depósitos de OCM. - Se observó un efecto significativo de interacción entre OPNm (10 µg/ml) y OPNb (10 µg/ml) con la cara {100} del OCM. - OPNb (10 µg/ml) provocó en los 31-58 mins de empleo modificaciones significativas en OCM, debido a que presentó una morfología en “forma de campana”.
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i></p> <p><i>Hunter et al. 2009</i>²⁹</p>	<p>Cristalización de depósitos de oxalato de calcio monohidratado (OCM) por ensayo de precipitación de soluciones iónicas</p>	<p>Empleo de 3 isoformas de OPN en soluciones por 45 min:</p> <ul style="list-style-type: none"> - OPN de leche bovina (OPNm), altamente fosforilada (2 y 5 µg/ml). - OPN de hueso de rata (OPNb), fosforilada en menor cantidad (2 y 5 µg/ml). - OPN recombinante (OPNr), sin fosforilación (2 y 5 µg/ml). 	<ul style="list-style-type: none"> - Las 3 isoformas de OPN (5 µg/ml) se adsorbieron significativamente en los bordes entre las caras cristalinas {100} y {121} de OCM. - OPNb y OPNm (5µg/ml) provocaron alteraciones significativas en el crecimiento (cristales más pequeños) y en la morfología (cristales cóncavos en forma de “campana”) del OCM. - OPNr (5µg/ml) no tuvo efectos significativos en el crecimiento ni morfología de OCM.
<p>Péptido ASARM derivado de MEPE <i>In vitro</i></p> <p><i>Addison et al. 2008</i>²⁴</p>	<p>Cultivo de células similares a osteoblastos MC3T3-E1 de calvaria murina en medio mineralizante</p>	<p>Empleo de 2 péptidos sintéticos derivados del dominio ASARM de MEPE humana en el día 1 de cultivo por 12 días.:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Péptido nativo (ASARM) (0-20 µM) - Péptido con 3 fosfoserinas (ASARMp) (0-20 µM) 	<ul style="list-style-type: none"> - ASARMp (1-20 µM) inhibió significativamente la deposición de calcio en cultivo, obteniendo un efecto inhibitor del 100% a concentración 20 µM. - ASARMp (20 µM) tuvo un efecto inhibitor del 100% cuando se empleó en cultivo en los días 6-12, lo que se correlaciona con la etapa de mineralización de la matriz. - ASARMp (20 µM) no tuvo efecto inhibitor en la actividad de ALP, en la deposición de colágena ni en los niveles de expresión de ARNm de osteocalcina y BSP en los cultivos. - ASARM nativo no mostró efecto inhibitor significativo en la deposición de calcio en los cultivos.

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i></p> <p><i>Grohe et al. 2007</i>⁵⁹</p>	<p>Cristalización de depósitos de oxalato de calcio monohidratado (OCM) por ensayo de precipitación de soluciones iónicas</p>	<p>Empleo de 3 péptidos derivados de OPN ósea de rata en soluciones por 45 min: Los péptidos (2 o 20 µg/ml) contenían cero (P0), uno (P1) o tres (P3) fosforilaciones en su secuencia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - P1 y P3 fueron los únicos que presentaron efectos significativos en la inhibición del crecimiento de OCM dependiente de la dosis. - P3 (20 µg/ml) fue el que causó mayor efecto inhibitor en el crecimiento cristalino en dirección a las caras cristalinas {001} en un 33%, {010} en un 13% y {100} en un 64%. - P3 (20 µg/ml) disminuyó en un 94% el volumen total de los depósitos de OCM. - En los 3 péptidos empleados se determinó que el ácido aspártico y ácido glutámico (no las fosfoserinas) son los aminoácidos en mayor contacto con la superficie del cristal.
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i></p> <p><i>Gericke et al. 2005</i>³⁰</p>	<p>Crecimiento de cristales semilla de HA (2 mg) por ensayo con un sistema dinámico de difusión iónica en gel</p> <hr/> <p>Cristalización de depósitos de HA por ensayo de precipitación de soluciones de fosfato de calcio amorfo</p>	<p>Empleo de un polímero de OPNm (leche bovina) ligado a transglutaminasa (0-100 µg/ml) solo para el ensayo de sistema en gel y 3 isoformas de OPN (0-100 µg/ml) en los 2 ensayos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - OPN de leche bovina (OPNm) fosforilado y no fosforilado. - OPN de hueso de rata (OPNb) fosforilado y no fosforilado. - OPN recombinante (OPNr), sin fosforilación. 	<ul style="list-style-type: none"> - De todos los grupos experimentales solo OPNb (100 µg/ml), OPNm (10 µg/ml) y el polímero de OPNm (25 µg/ml) inhibieron significativamente la formación y crecimiento de HA en un sistema en gel. - OPNm y OPNb en bajas concentraciones (0-10 µg/ml) mostraron un efecto mínimo sobre la conversión cristalina a HA. - OPNm en concentraciones altas (50 µg/ml), solo tuvo efecto significativo en retardar la conversión a HA.
<p>Proteínas Fetuina-A y Osteoprotegerina (OPG) <i>In vitro</i></p> <p><i>Moe et al. 2005</i>⁶⁰</p>	<p>Cultivo de células musculares lisas vasculares bovinas en medio osteoinductor con suero de pacientes urémicos o suero normal</p>	<p>Empleo de fetuina-A (0, 100, 500 y 1000 µg/mL) y de OPG (0 y 200 ng/mL) en los días 7 y 14 de cultivo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Fetuina-A (1000 µg/mL) disminuyó significativamente los niveles de mineralización solo en los cultivos con suero normal. - OPG (200 ng/mL) no tuvo efecto inhibitor en los niveles de mineralización en cultivos tanto con suero normal como urémico. - Células en medio osteoinductor y sin empleo de fetuina y OPG mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión de ARNm de proteína gla de la matriz dependiente del día de cultivo, principalmente en los grupos con suero urémico.

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo <i>Ref.</i>	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vivo</i></p> <p><i>Ohri et al. 2005</i>⁶¹</p>	<p>Modelo animal Ratas hembra deficientes de OPN (n=11) con implantes subcutáneos de tejido de pericardio bovino fijado con glutaraldehído (0,625%) en espalda de cada rata por 3, 7, 14 y 30 días</p>	<p>Ratas en 2 grupos aleatorios: - Grupos experimentales (n=8) se inyectaron en el lugar del implante 100 µl de una solución de dif. isoformas de OPN: OPN recombinante de rata (850 µg/ml), OPN con 6 histidinas (850 µg/ml), OPN fosforilada (850 µg/ml) u OPN fosforilada con un dominio RGD (arginina-glicina-aspartato) (850 µg/ml). - Grupos control (n=3) se inyectaron PBS (100 µl). Los puntos de tiempo de las inyecciones fueron en los días 2, 4 y 6 (siendo el día 0 el día del implante). Los explantes se obtuvieron en el día 7.</p>	<p>- En los explantes de los días 7, 14 y 30 sin intervención se observó un aumento significativo de los niveles de calcio. - Administración de OPN recombinante en los sitios de los implantes de los grupos experimentales redujo significativamente la deposición de calcio en aprox. 72% en comparación con los grupos control. - OPN con 6 histidinas no tuvo efecto inhibitor de la deposición de calcio. - OPN fosforilada y con un dominio RGD mostro el máximo efecto inhibitor de la deposición de calcio a comparación con los grupos control. - OPN fosforilada con RGD aumento los niveles de anhidrasa carbónica en las células periféricas al implante.</p>
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i></p> <p><i>Pampena et al. 2004</i>⁶²</p>	<p>Cristalización de depósitos de HA por ensayo de autotitulación de composición constante</p>	<p>Empleo de 4 péptidos derivados de OPN de hueso de rata por 600 min: - OPN 7-17 (2 fosfoserinas) (0-40 µg/ml). - OPN 41-52 (2 fosfoserinas) (0-40 µg/ml). - OPN 248-264 (3 fosfoserinas) (0-40 µg/ml). - OPN 290-301 (con 3 fosfoserinas) (0-40 µg/ml).</p>	<p>- Péptidos OPN 41-52 y OPN 290-301 presentaron un efecto inhibitor aprox. 4 veces más potente en la formación y crecimiento de HA dependiente de la dosis, a comparación de los otros péptidos estudiados. - OPN 41-52 fue el inhibitor más eficaz en un análisis de tiempo constante, al tener el potencial de inhibir por 50.1 minutos la formación y crecimiento de HA por cada 1 µg/ml de péptido empleado.</p>
<p>Proteína MEPE y péptido derivado ASARM <i>In vitro</i></p> <p><i>Rowe et al. 2004</i>⁶³</p>	<p>Cultivo de células similares a osteoblastos murinos 2T3 en medio mineralizante con BMP-2 (100 ng/ml) o sin BMP-2</p>	<p>Empleo en los días 13 y 20 de cultivo de: - Proteína MEPE humana (0, 100, 500 y 800 ng/ml). - Péptido ASARM derivado de MEPE (60 y 300 ng/ml).</p>	<p>- Proteína MEPE en alta concentración (500 ng/ml) inhibió significativamente la mineralización tanto en el día 13 como 20 de cultivo con BMP2. - MEPE en los cultivos sin BMP2 no tuvo efecto significativo sobre la mineralización y las células eran idénticas a los cultivos controles. - Péptido ASARM (60 ng/ml) inhibió significativamente la mineralización en los cultivos con BMP2, pero no mostro un mejor potencial inhibitor que la proteína MEPE.</p>

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Proteína BMP-2 <i>In vitro</i> <i>Zhao et al. 2003</i>⁶⁴</p>	<p>Cultivo de cementoblastos murinos OC-CM 30 en medio mineralizante con noggin (1 mg/mL) o sin noggin.</p>	<p>Empleo de BMP-2 (0-300 ng/ml) en el día 1 de cultivo por 5 días</p>	<ul style="list-style-type: none"> - BMP-2 disminuyó significativamente los niveles de expresión de ARNm de la sialoproteína ósea y colágena tipo I de forma dependiente de la dosis. - BMP-2 (300 ng/ml) aumentó significativamente los niveles de expresión de ARNm de OPN y OC. - BMP-2 inhibió significativamente la formación de nódulos minerales de forma dependiente de la dosis. - Noggin (100 ng/ml) revirtió significativamente el efecto inhibitor de BMP-2.
<p>Proteína Fetuina <i>In vitro</i> <i>Price et al.2003</i>⁶⁵</p>	<p>Cristalización de depósitos de HA por ensayo de precipitación de soluciones iónicas</p>	<p>Empleo de fetuina (0-5 mg/ml) por 48 hrs y 14 días en las soluciones de precipitación</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Fetuina (5 mg/ml) inhibió de manera significativa la precipitación de una fase mineral de fosfato de calcio, y la solución permaneció estable en molaridad durante 3 horas de observación. - Fetuina (5 mg/ml) provocó disminución de los niveles de calcio, de 5 a 3 mM en 1 hora y de 3 a 0,9 mM entre las 20-24 h de empleo. - En las soluciones control (sin empleo de fetuina) la precipitación a depósitos minerales se produjo a los 10 minutos de ensayo. - Se demostró que los cambios en los niveles de calcio en solución se deben a la formación de complejos de calcio-fosfato-fetuina estable entre los días 2-14.
<p>Hormona Paratiroidea (PTH) y Proteína gla de la matriz (MGP) <i>In vitro</i> <i>Gopalakrishnan et al. 2001</i>⁶⁶</p>	<p>Cultivo de células similares a osteoblastos MC-4 en medio mineralizante</p>	<p>Empleo de PTH (10⁻⁷M) en el día 6 de cultivo por 2 días. Además, para el estudio de acción de PTH se empleó:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vitamina K (10 μM) - Warfarina (20 μM) 	<ul style="list-style-type: none"> - PTH inhibió la mineralización en los cultivos aprox. en un 30% después de 3 hrs y 50% después de 6 hrs del empleo. - PTH indujo a las 3 hrs un aumento significativo en el nivel de expresión de ARNm de MGP, y después de 6 hrs, la expresión de MGP fue de 6-8 veces mayor. - Warfarina (inhibidor de MGP) inhibió los efectos de la PTH sobre la mineralización en cultivo, mientras que la vitamina K aumentó la actividad de la PTH. - Se determinó que la inhibición de la mineralización en cultivos se correlaciona con la inducción de la expresión de MGP.

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i> <i>Jono et al. 2000</i>⁶⁷</p>	<p>Cultivo de células musculares lisas vasculares de aorta fetal humano en medio osteoinductor con un sistema de elevación del fosfato inorgánico (2 mM)</p>	<p>Empleo en cultivos en los días 1-4 de: - OPN total nativa con (0-15 nM) o sin fosforilación (0-75 nM). - Fragmentos N- y C- terminal de OPN con o sin fosforilación (15 nM).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - OPN nativa (15 nM) inhibió significativamente la deposición de calcio en cultivos. - OPN fosforilada (75 nM) mostro el potencial más alto de inhibición de 31% en la deposición de calcio comparado con el efecto de OPN nativa. - El efecto de OPN se potencia acorde al tiempo de fosforilación sometida, debido a que 90 minutos de fosforilación de OPN, mostro un más alto efecto inhibidor significativo. - Fragmentos fosforilados de OPN (15 nM) inhibieron significativamente la deposición de calcio, con resultados similares a la OPN total fosforilada (15 nM).
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i> <i>Wada et al. 1999</i>⁶⁸</p>	<p>Cultivo de células musculares lisas vasculares de aorta bovina en medio osteoinductor. Se realizo un estudio de adición de calcio (1.8-2.8 mM) al medio de cultivo.</p>	<p>Empleo de OPN (0.05-5 µg/ml) purificada de cultivos de células musculares lisas neonatales de rata en el día 4 de cultivo por 10 días.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - OPN inhibió significativamente la deposición de calcio en los cultivos dependiente de la dosis. - OPN (5 µg/ml) no inhibió la actividad de la ALP ni redujo los niveles de fósforo en el medio de cultivo. - La adición de calcio a los cultivos (2.8 mM) revirtió el efecto inhibidor de OPN sobre la deposición de calcio. - Se reporto que la OPN estaba íntimamente asociada en el crecimiento de los cristales, lo que mostro que el efecto inhibidor de OPN no estaba mediado solo por la quelación de calcio, sino por la interacción directa de OPN con las superficies de los cristales.
<p>Proteína Activina A <i>In vitro</i> <i>Ikenoue et al. 1999</i>⁶⁹</p>	<p>Cultivo de células similares a osteoblastos aislados de calvaria de rata Sprague-Dawley en medio mineralizante</p>	<p>Empleo de activina-A recombinante humana (0-100 ng/ml) en los días 0-5, 5-9, 9-14 o 14-19 de cultivo</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Activina A disminuyó el número y tamaño promedio de los nódulos minerales en cultivo dependiente de la dosis, teniendo mayor eficacia cuando se agregó en los días 0-5 de cultivo. - No tuvo efecto significativo en el crecimiento de nódulos minerales cuando se agregó Activina A en los días 14-19 de cultivo. - No tuvo efecto negativo en la proliferación de las células en cultivo. - Activina A disminuyo significativamente los niveles de expresión de ARNm de COL tipo I, ALP, ON y OPN en cultivo.

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) <i>In vitro</i></p> <p><i>Hsieh et al. 1998</i>⁷⁰</p>	<p>Cultivo de células similares a osteoblastos aislados de calvaria de rata en medio mineralizante</p>	<p>Empleo del dímero PDGF-BB (0-50 ng/ml) en el día 1 de cultivo por 5 semanas</p>	<ul style="list-style-type: none"> - PDGF-BB disminuyó significativamente el área total de los nódulos mineralizados en cultivo dependiente de la dosis, teniendo un efecto inhibitorio del 100% a 50 ng/ml. - PDGF-BB (50 ng/ml) aumentó significativamente la proliferación celular cuando se empleó en las semanas 2-3 de cultivo. - PDGF-BB empleado antes del día 21 mostró el mayor efecto en la actividad de ALP, al provocar una reducción del 70-80% a largo plazo. - PDGF (50 ng/ml) tuvo mayor efecto inhibitorio de la mineralización al emplearlo por largos periodos de tiempo en cultivo (0-35 días). - PDGF (50 ng/ml) empleado por periodos cortos en cultivo (días 7 y 14 de cultivo) tuvo un efecto promotor en la mineralización.
<p>Péptido Endotelina (ET) <i>In vitro</i></p> <p><i>Hiruma et al. 1998</i>⁷¹</p>	<p>Cultivo de células similares a osteoblastos aislados de calvaria de rata Wistar recién nacida en medio mineralizante</p>	<p>Empleo de 3 isoformas de endotelina (10⁻⁷M): ET-1, ET-2 y ET-3 en el día 1 de cultivo por 14 días</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ET-1 y ET-2 con resultados similares, disminuyeron significativamente la deposición de calcio, mostrando un efecto inhibitorio más potente comparado con ET-3. - ET-1 y ET-2 disminuyeron en un 40% el número y el área total de los nódulos mineralizados en cultivo comparado con los grupos control, y con mayor eficacia que ET3.
<ul style="list-style-type: none"> - Osteopontina (OPN) - Osteocalcina (OC) - Osteonectina (ON) - Sialoproteína ósea (BSP) - Fosforina de la dentina (DPP) - Condrocálcina (CC) <p><i>In vitro</i></p> <p><i>Hunter et al. 1996</i>⁷²</p>	<p>Cristalización de depósitos de HA por ensayo de autotitulación de composición constante</p>	<p>Empleo de proteínas asociadas a tejido mineral en un periodo de 1000 minutos en el ensayo, cada una en diferentes grupos experimentales en rangos de concentración 0,01-10 µg/ml</p>	<ul style="list-style-type: none"> - De todas las proteínas empleadas en el estudio, solo la OPN y OC mostraron un efecto inhibitorio significativo. - OPN (0.32-10 µg/ml) fue el inhibidor más potente, específicamente en la formación y crecimiento de depósitos de HA dependiente de la dosis. - OC solo a altas concentraciones (6.1-10 µg/ml) mostró un efecto inhibitorio en la HA, específicamente mediante el retraso de la nucleación de los depósitos.

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) <i>In vitro</i></p> <p>Talley-Ronsholdt et al. 1995⁷³</p>	<p>Cultivo de células similares a osteoblastos aisladas de calvaria de rata Sprague-Dawley recién nacida con medio mineralizante y en geles de colágena o en monocapas</p>	<p>Empleo de TGF-β1 (0-10 pM) recombinante humana y de plaquetas porcinas en el día 1 de cultivo por 24 días</p>	<ul style="list-style-type: none"> - TGF- β1 (8-10 pM) tuvo un efecto mínimo pero significativo de inhibición del crecimiento celular (aprox. 16-18%) en el día 12 tanto en los cultivos en gel de colágena como en monocapa. - TGF-β1 (10 pM) disminuyó de manera significativa la actividad de ALP en aprox. 50% en el día 12 de los cultivos en geles de colágena. - TGF-β1 (10 pM) inhibió al 100% la deposición de minerales en los cultivos en monocapa y en aprox. al 95% en los cultivos en geles de colágena en el día 19.
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i></p> <p>Polipéptido sintético de ácido aspártico (poly-aa) <i>In vitro</i></p> <p>Hunter et al. 1994⁷⁴</p>	<p>Cristalización de depósitos de HA mediante 2 ensayos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - autotitulación de composición constante. - geles de agarosa. 	<p>En ensayo de autotitulación, se empleó de OPN (0-1 µg/ml) purificada de calvaria porcina y OPN desfosforilada o descarboxilada (0.01-4 µg/ml) en un periodo de 1000 minutos.</p> <p>En ensayo con geles de agarosa se empleó por 5 días:</p> <ul style="list-style-type: none"> - OPN nativa, desfosforilada y descarboxilada (0-100 µg/ml) - Poly-aa (100-250 µg/ml) 	<ul style="list-style-type: none"> - OPN sin modificaciones inhibió significativamente la formación de depósitos de HA en el ensayo de autotitulación dependiente de la dosis. - OPN desfosforilada no tuvo efecto inhibitorio significativo en la formación de HA por autotitulación. - Polipéptido poly-aa (100 µg/ml) inhibió aprox 31% la formación de HA en el ensayo de gel de agarosa. - OPN desfosforilada (100 µg/ml) tuvo una actividad inhibitoria de la formación de HA menor de 40 veces comparado con el efecto de OPN nativa. - OPN descarboxilada (100 µg/ml) tuvo una actividad inhibitoria de la formación de HA menor de 6 veces comparado con el efecto de OPN nativa.
<p>Proteína Osteopontina (OPN) <i>In vitro</i></p> <p>Boskey et al. 1993⁷⁵</p>	<p>Cristalización de depósitos de HA por 2 ensayos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sistema de difusión en gel. - Crecimiento de cristales semilla de HA (2 mg) por ensayo de composición constante. 	<p>Empleo de 3 isoformas de OPN en ambos ensayos (sistema de difusión en gel por 3.5 días y crecimiento de cristales semilla por 5 días) de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - OPN ósea de rata (0-100 µg/ml). - OPN ósea bovina (0-100 µg/ml). - OPN bovina desfosforilada (0-100 µg/ml) 	<ul style="list-style-type: none"> - OPN ósea de rata (100 µg/ml) disminuyó significativamente la formación de HA en ambos ensayos de cristalización. - OPN ósea bovina (50-100 µg/ml) disminuyó significativamente la formación de HA en sistema de difusión y a 100 µg/ml inhibió el crecimiento de cristales de HA. - OPN de rata y bovina (100 µg/ml) en interacción con HA provocaron una disminución significativa en la longitud de los cristales semilla. - La desfosforilación parcial de OPN (100 µg/ml) eliminó su efecto inhibitorio y redujo su capacidad de fijación a calcio.

Tabla II. Cont.

Proteína o péptido/ entorno de empleo Ref.	Descripción de población	Descripción de la intervención	Resultados reportados
<p>Proteína Osteonectina (ON) <i>In vitro</i></p> <p><i>Doi et al. 1989</i>⁷⁶</p>	<p>Cristalización de diferentes fases minerales de fosfato de calcio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fosfato dicálcico dihidratado (FDD) - Fosfato octacálcico (FOC) - Hidroxiapatita (HA) 	<p>La precipitación de las soluciones de calcio y fosfato se trataron primero con colágena tipo I (0-2 mg). Después se empleó ON (0-0.64 mg) en periodos de 0-4 días en soluciones.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Colágena tipo I (2 mg) no tuvo ningún efecto significativo sobre las reacciones asociadas con la ON (0.64 mg) ni se observó correlación estructural entre colágena-ON-fosfatos de calcio. - ON (0.64 mg) tuvo efecto inhibitorio significativo en todas las fases de fosfatos de calcio (FDD, FOC, HA) al emplearla en diferentes periodos en solución, debido a que retrasó la precipitación, transformación y crecimiento cristalino de apatita. - Se determinó que el principal mecanismo de la ON como inhibidor de la formación de apatita es bloquear los sitios de crecimiento de los fosfatos de calcio nucleados.
<p>Proteína Interleucina 1 (IL-1) <i>In vitro</i></p> <p><i>Stashenko et al. 1987</i>⁷⁷</p>	<p>Cultivo de células similares a osteoblastos aisladas de calvaria de rata Sprague-Dawley recién nacidas en medio mineralizante</p>	<p>Empleo de IL-1β (0.002-20 U/ml) en los días de cultivo 4, 7, 10, 13 y 16; Y en los periodos de cultivo: de 1-4, 1-7, 1-10 y 1-16 días</p>	<ul style="list-style-type: none"> - IL-1β (2-20 U/ml) inhibió al 100% la formación de nódulos minerales solo cuando se empleó en cultivo a partir del día 4 hasta el día 13. - En el estudio de diferentes periodos de cultivo, IL-1β (2 U/ml) tuvo efecto inhibitorio significativo solo en los periodos 1-7, 1-10 y 1-16 días de cultivo. - IL-1β (2 U/ml) empleado en el día 7 de cultivo, disminuyó significativamente la proliferación celular, la síntesis de proteínas colágenas y no colágenas, y la actividad ALP.



En cuanto a las proteínas y/o péptidos bioactivos evaluadas (**Tabla III**), se destaca la osteopontina (OPN), al ser la molécula polipeptídica más estudiada de acuerdo a los estudios incluidos, seguida de la proteína de la matriz Gla (MGP) y la fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE), tomando en cuenta que han sido empleadas con diferentes isoformas y estudiadas por medio de sus péptidos derivados; mientras que el péptido más empleado fue VTK.

Tabla III. Proteínas y péptidos evaluados en los estudios incluidos.

Molécula polipeptídica	Cantidad de estudios evaluados	Referencias
OPN	19	29, 30, 36, 41, 44, 45, 48, 51, 54, 55, 58, 59, 61, 62, 67, 68, 72, 74, 75
MGP	3	43, 47, 66
MEPE	3	24, 52, 63
Activina A	2	42, 69
Factores de crecimiento	3	FGF-21 ³⁷ , PDGF-BB ⁷⁰ , TGF-B ⁷³
Otras proteínas	8	OPG ³⁴ , SCL ⁵⁰ , AN ⁵⁷ , Fetuina-A y OPG ⁶⁰ , BMP-2 ⁶⁴ , Fetuina ⁶⁵ , ON ⁷⁶ , IL-1 ⁷⁷
Péptido VTK	2	39, 56
Otros péptidos	8	CAP-pi y CAP-pip ³³ , FTI-277 ³⁵ , Péptidos derivados de estaterina ³⁸ , CNP ⁴⁰ , poly-glu ⁴⁶ , Ghrelina ⁴⁹ , IMD ⁵³ , ET ⁷¹

Por otra parte, solo 21 estudios de los 48 incluidos reportaron como parte de sus resultados un análisis fisicoquímico de la proteína y/o péptido empleado; aunque algunos de ellos con información inconclusa en ciertos parámetros, como se muestra en la **Tabla IV**.



Tabla IV. Características fisicoquímicas reportadas de proteínas y/o péptidos en estudios incluidos (NR: No Reportado).

Molécula polipeptídica	No. aminoácidos	Peso molecular	Punto Isoeléctrico	Otras características fisicoquímicas reportadas	Referencias
OPN ósea de rata	~300	NR	4.5	29 sitios de fosforilación (serinas), 4 O-glicanos y 1 sitio de sulfatación de tirosina.	
OPN porcina	NR	32 kDa	NR	Mayor proporción de residuos de glicina, ac. aspártico y serina en su secuencia.	36, 41, 44, 48, 55, 58, 72
OPN de leche bovina	~ 262	29.28 kDa	NR	28 sitios de fosforilación (serinas) y 3 sitios de glicosilación (treoninas).	
OPN renal humana	~ 298	37700 g/mol	NR	31 sitios de fosforilación, 5 O-glicanos. 75 aminoácidos ácidos (25%), 7 carboxilatos consecutivos.	
Fragmento SKK derivado de OPN de leche bovina	56	6.506 kDa	NR	- 6 sitios de fosforilación (serinas)	44
Péptido P3 derivado de OPN ósea de rata	16	1972 g/mol	2.98	- 3 sitios de fosforilación (serinas) - Carga neta en pH 6.7: -8.1 - Valor empírico de hidrofilia: 99.58 kJ/mol	45
Péptido pOPAR derivado de OPN ósea de rata	16	1913 g/mol	3.58	- 1 sitio de fosforilación (serinas) - Carga neta en pH 6.7: -11.7 - Valor empírico de hidrofilia: 141 kJ/mol	45
Péptido sintético SDESDE fosforilado derivado de OPN	6	NR	NR	- 2 sitio de fosforilación (serinas) - Media de energía de unión a HA: [100] = -1647 kcal/mol y [001] = 4371 kcal/mol	54
Péptido ASARM derivado de OPN humana con 3 fosforilaciones (serinas)	18	2309 g/mol	3.3	- Dominio central de OPN. - Fosforilación de 5 serinas del péptido, se obtiene un punto isoelectrico teórico de 2.6. - Energía de adsorción péptido-hidroxiapatita en unidades de energía Rosetta (REU): -57.8 (fosforilación de 5 serinas se obtiene -59.7)	55
Péptido OPN41-52 derivado de OPN ósea de rata	12	1.467 kDa	NR	- Péptido presenta 2 fosfoserinas más 2 residuos de ac. Aspártico y 2 de ac. Glutámico, lo que le genera un carácter ácido	62
Proteína Gla de la matriz (MGP)	84	NR	NR	- 5 sitios de γ -carboxilación (ac. glutámico) - 3 sitios de fosforilación (serinas) - Estructura secundaria: 21% α -hélice	43, 47



Molécula polipeptídica	No. aminoácidos	Peso molecular	Punto Isoeléctrico	Otras características fisicoquímicas reportadas	No. estudio en presente revisión
Péptido YGlapS derivado de MGP	14	1998 g/mol	2.23	- Escala empírica de hidrofiliía de Hopp y Woods: 56.5/4.03 kJ/mol - Carga neta en pH fisiológico (7.4): -9.1 - 3 sitios de fosforilación (serinas) y 1 de γ -carboxilación (ac. glutámico) - Estructura secundaria: 30.5% de conformación aleatoria, 23.9% cadenas β y 20.6% giros	43
Péptido YEpS derivado de MGP	14	1954 g/mol	2.36	- Escala empírica de hidrofiliía de Hopp y Woods: 54.4/3.89 kJ/mol - Carga neta en pH fisiológico (7.4): -8.6 - 3 sitios de fosforilación (serinas) - Estructura secundaria: 36.8% de conformación aleatoria, 22.2% cadenas β y 22.4% giros	43
Fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE)					
MEPE humano	525	~65 kDa	NR	NR	63
MEPE rata	434	NR	NR	NR	
Péptido ASARM derivado de MEPE				- Dominio C-terminal de MEPE	
ASARM humano	19	1905 g/mol	NR	- 9 sitios de fosforilación (serinas)	24
ASARM rata	18	1785 g/mol	NR	- 10 sitios de fosforilación (serinas)	
Péptido VTK fosforilado	12	NR	4.8	- 2 sitios de fosforilación (serinas) - Energía de unión a HA: -13.6 (\pm 2.8) kcal/mol	39, 56
Péptido CAP-pi	14	NR	3.49	- Valor de hidropatía GRAVY: -0.0914 - Estructura secundaria: 85% de conformación aleatoria - 3 sitios de fosforilación (serinas)	33
Péptido CAP-pip	14	NR	1.8	- Presenta 3 fosfoserinas en su secuencia - Valor de hidropatía GRAVY: -0.0914 - Estructura secundaria: 90% de conformación aleatoria	33
Estaterina	43	5308 g/mol	4.41	2 sitios de fosforilación (serinas)	38
Péptido DR9 derivado de estaterina	9	1270 g/mol	3.63	2 sitios de fosforilación (serinas)	38
Adiponectina	NR	~ 30 kDa	NR	- Contiene una secuencia señal N-terminal, un dominio variable, un dominio similar a colágena y un dominio globular C-terminal	57



Molécula polipeptídica	No. aminoácidos	Peso molecular	Punto Isoeléctrico	Otras características fisicoquímicas reportadas	No. estudio en presente revisión
Fetulina	NR	59 kDa	NR	- Consta de dos dominios N-terminal de cistatina	65
Osteocalcina	49	5.5 kDa	NR	- 2-3 sitios de γ -carboxilación (ac. glutámico) - Cuenta en mayor proporción de residuos de Glicina, Alanina, Ac. Aspártico y Prolina en su secuencia	72

8.3 Riesgo de sesgo.

Se realizó la evaluación de riesgo de sesgo de los estudios incluidos para analizar la calidad metodológica con el empleo de las herramientas RoB 2 CRIBSHEET y SYRCLE. Las **FIG 4** y **FIG 5** resumen la evaluación del riesgo de sesgo de los estudios *in vitro* e *in vivo* respectivamente.

En la evaluación de los 46 estudios *in vitro*, se obtuvo una puntuación global de bajo riesgo de sesgo en todos los dominios: cegamiento de la evaluación de resultados (sesgo de detección) (>95%), datos de resultados incompletos (sesgo de deserción) (>85%), información selectiva (sesgo de información) (>80%) y otros sesgos (75%) (**FIG 4**).

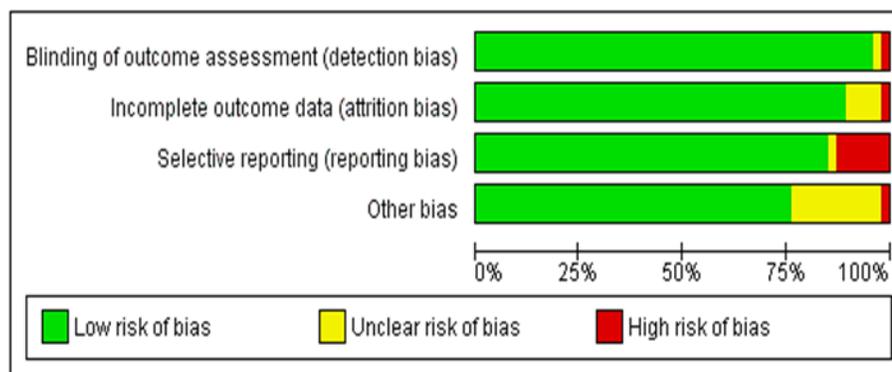


FIG 4. Evaluación de riesgo de sesgo de estudios *in vitro* incluidos cuantificada en el software RevMan®. Barra color verde: bajo riesgo; barra color amarillo: riesgo poco claro; barra color rojo: alto riesgo.



En la evaluación de los 4 estudios *in vivo*, se obtuvo una puntuación dispersada, pero con la mayoría de dominios con bajo riesgo de sesgo: generación de secuencias aleatorias (sesgo de selección) (75%), cegamiento de la evaluación de resultados (sesgo de detección) (100%), datos de resultados incompletos (sesgo de deserción) (100%), información selectiva (sesgo de información) (100%) y otros sesgos (50% poco claro, 50% bajo riesgo) (**FIG 5**).

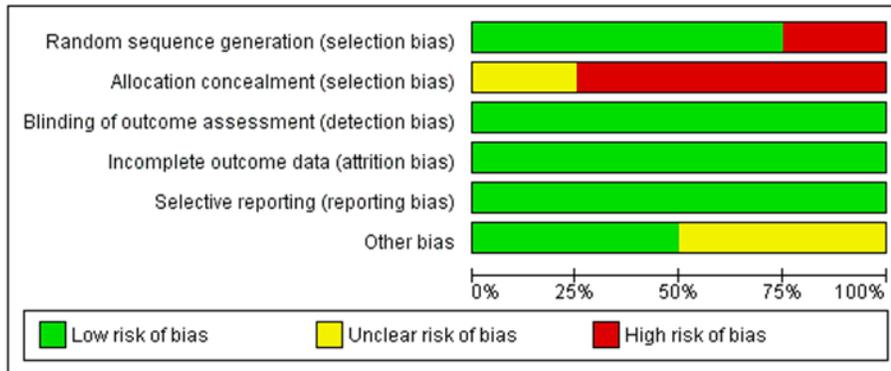


FIG 5. Evaluación de riesgo de sesgo de estudios *in vivo* incluidos cuantificada en el software RevMan®. Barra color verde: bajo riesgo; barra color amarillo: riesgo poco claro; barra color rojo: alto riesgo.

En el dominio de ocultación de la asignación (sesgo de selección) se obtuvo una evaluación global de 75% alto riesgo y 25% poco claro, sin embargo no se excluyó ningún estudio después de la evaluación (**FIG 5**).

9. DISCUSIÓN

Las calcificaciones ectópicas formadas en los tejidos blandos se caracterizan por presentarse en una gran variabilidad de las fases minerales, principalmente hidroxapatita, oxalato de calcio (mono- y dihidratado) y whitlockita. Sin embargo, en ambos casos, la matriz extracelular y las proteínas secretadas desempeñan un papel fundamental durante la formación de minerales.⁷⁸



Por lo tanto, la biomineralización y la calcificación ectópica pueden considerarse mecanismos sistémicos en los que la precipitación está modulada por moléculas que pueden interactuar con los cristales y así, promover la nucleación y desarrollo del crecimiento cristalino o, por el contrario, inhibir la nucleación, atenuando el crecimiento y/o afectando la maduración a fases minerales amorfas.

En nuestra revisión se analizaron diversos trabajos de investigación publicados en diferentes países del mundo; sin embargo, el desarrollo de esta área de investigación se ha llevado a cabo gracias a grupos de investigadores y sus colaboraciones en institutos y universidades de Norteamérica, principalmente en Canadá y Estados Unidos.

A través de la búsqueda y análisis de artículos publicados acerca del estudio de diversas proteínas y péptidos inhibidores de la mineralización tanto *in vitro* como *in vivo*, se evidencio que la OPN es la proteína más empleada por su claro papel inhibidor, ya sea al emplear sus diferentes isoformas o por medio de péptidos derivados.

La OPN es una proteína de la matriz extracelular que pertenece a la subfamilia SIBLING (pequeñas glicoproteínas de unión a ligandos de integrina) y de las fosfoproteínas secretadas de unión a calcio. Esta proteína se expresa en varios sitios del cuerpo, pero es abundante en la matriz extracelular de células del tejido óseo y dientes, en entornos ectópicos de mineralización (tejidos blandos) y en fluidos tisulares sobresaturados de iones minerales.³⁶

El estudio más antiguo, incluido en esta revisión, acerca del empleo de OPN fue de *Boskey et al.* en el cual, utilizando 2 ensayos diferentes de cristalización, demostraron la disminución en la formación de hidroxapatita con el empleo de 2 isoformas de OPN (ósea bovina y ósea de rata), y reportaron la importancia de los grupos fosfatos para el efecto inhibidor de la proteína, debido a que la desfosforilación de OPN provocó una reducción en su capacidad de fijación a calcio.⁷⁵



Desde años atrás se mantuvo la hipótesis de que proteínas asociadas a tejido mineral podrían tener efectos inversos en la mineralización. Bajo esa teoría, *Hunter et al.* realizaron un estudio para analizar diferentes proteínas en un ensayo de autotitulación por composición constante, y reportaron que la osteocalcina (OC) empleada en altas dosis actúa como un atenuador de la nucleación mineral y además, confirmaron el papel inhibidor de la OPN.⁷²

Bajo el análisis de nuestra revisión encontramos que la OPN, en sus diferentes isoformas, con presencia de fosforilaciones y dependencia de dosis, aumenta el efecto inhibidor en el crecimiento y desarrollo de hidroxapatita en ensayos *in vitro*^{36,41,44,54,30,62,72,74,75}; además posee la capacidad de inhibir la formación de oxalato de calcio monohidratado (OCM)^{45,48,58,59}, promueve la formación de oxalato de calcio dihidratado (OCD)^{45,48} y disminuye la deposición de calcio en cultivos celulares^{29,36,55,67,68}.

Se ha reportado que la presencia de OCD reduce las tasas de recurrencia de calcificaciones, debido a que se excretan más fácilmente antes de que se produzca la retención y se desarrolle la formación de cálculos (por ejemplo, en riñón), posiblemente porque los cristales dihidratados son menos propensos que los de OCM a adherirse a las superficies celulares.⁷⁹

Además de la OPN, existen otras proteínas que pertenecen a la subfamilia SIBLING, como es el caso de la sialofosfoproteína de la dentina (DSPP), la proteína de matriz de la dentina-1 (DMP-1), la sialoproteína ósea (BSP) y la fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE), las cuales poseen características en común, como la presencia de un motivo altamente conservado y rico en serina-aspartato (motivo ASARM), y que originalmente se ha reportado que la presencia de dicha secuencia podría desempeñar un papel en la modulación de la mineralización.^{52, 63}

La proteína MEPE es una biomolécula que se expresa exclusivamente en los osteoblastos, osteocitos y odontoblastos, con mayor presencia en osteoblastos asociados al raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (Hyp) y en tumores de osteomalacia hipofosfatémica oncogénica (OHO).⁶³



Dado que estos síndromes se asocian a anomalías en la mineralización, *Rowe et al.* estudiaron los efectos de MEPE humana de longitud completa y el péptido ASARM derivado de MEPE en cultivo de células similares a osteoblastos.⁶³ Sus hallazgos mostraron que el péptido ASARM inhibió significativamente la mineralización en cultivo, pero la proteína MEPE tuvo un mayor potencial inhibitor específicamente a una concentración alta, lo cual concuerda con lo reportado por *Boskey et al.*⁵² acerca de que la proteína MEPE a bajas dosis actúa como promotor del crecimiento de HA, pero a altas dosis obtiene un carácter inhibitor.

Addison et al. estudiaron 2 péptidos derivados de MEPE, el péptido ASARM nativo (sin modificaciones) y un péptido con 3 fosfoserinas (ASARMp), y demostraron que la fosforilación del péptido le proporcionó un efecto inhibitor potente en la deposición de calcio en cultivo, lo cual continuaba aportando información determinante acerca de la posible eficacia de las modificaciones post-traduccionales en los inhibidores.²⁴

Con el pasar de los años, muchas investigaciones se han centrado en estudiar a los factores de crecimiento debido a que pueden tener efectos pleiotrópicos en diferentes procesos fisiológicos, por lo que el campo de estudio de los inhibidores no ha sido la excepción.

En este sentido, *Talley-Ronsholdt et al.* emplearon diferentes isoformas del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) para evaluar su efecto en cultivo de células similares a osteoblastos tanto en monocapas como en geles de colágena. Demostraron que el TGF- β 1 tuvo un potente efecto inhibitor en la deposición de minerales en los cultivos tanto en monocapa como en geles de colágena hasta el día 19 de cultivo, lo que sugiere un papel inhibitor en etapas específicas durante la mineralización en la matriz extracelular.⁷³

Resultados similares fueron obtenidos por *Hsieh et al.*, quien empleó el dímero BB del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), y reportó un papel atenuador del área total de los nódulos mineralizados en cultivos de células similares a osteoblastos solo al emplearlo por largos períodos de cultivo (0-35 días), ya que al emplear el PDGF por periodos cortos (días 7 y 14 de cultivo) se observó un efecto promotor de la mineralización.⁷⁰



Otra molécula polipeptídica muy relevante en este campo de los inhibidores, es la proteína de la matriz gla (MGP), la cual es una proteína fosforilada y γ -carboxilada que se expresa en altos niveles en el corazón, el pulmón y el riñón. En humanos, la expresión del gen de la MGP está sobre expresado en placas ateroscleróticas, lo que sugiere que la proteína es un inhibidor inducible de la calcificación.⁴³

Gopalakrishnan et al. realizaron un estudio *in vitro* en cultivo de células similares a osteoblastos empleando la hormona paratiroidea (PTH), vitamina K y Warfarina, donde se reportó la inhibición de la mineralización en cultivos por el empleo de PTH y un aumento en los niveles de expresión de ARNm de MGP, efecto que fue erradicado con el empleo de Warfarina (el cual es un inhibidor de MGP) y recuperado con la presencia de vitamina K en cultivo. Estos resultados mostraron que la rápida inhibición de la mineralización en cultivo inducida por el tratamiento de PTH se explica, al menos en parte, por la inducción de la proteína MGP.⁶⁶

En los últimos años se ha explorado el papel de péptidos derivados de una secuencia proteica con el fin de sopesar el efecto que conlleva el emplear moléculas con mayor cantidad de aminoácidos, y la MGP ha sido un claro ejemplo de la eficacia de dichos estudios.

O'Young et al. emplearon péptidos derivados de diferentes secciones de la secuencia de MGP, además de péptidos desfosforilados y des- γ -carboxilados, con el fin de determinar cuáles son las características químicas más importantes para obtener un efecto inhibidor en el crecimiento de HA.⁴⁷ Sus resultados demostraron que el péptido YGlapS, el cual contenía grupos fosfato y residuos γ -carboxilados, tenía el efecto inhibidor más potente, este efecto asociado específicamente por ser un péptido fosforilado; estos resultados también fueron corroborados por estudios hechos por *Goiko et al.*⁴³

Muchos péptidos bioactivos se han identificado tanto en el interior de la estructura de diversas proteínas, como en secuencias libres e inactivas, y pueden ejercer determinadas actividades biológicas tras su modificación por hidrólisis química o enzimática. Estas secuencias han sido ampliamente utilizadas para inducir o bloquear pasos clave durante el desarrollo de ciertas actividades celulares, ofreciendo una nueva gama de alternativas para el control de enfermedades.⁸⁰



Uno de los péptidos relevantes identificado en nuestra revisión fue pVTK, el cual es una secuencia de 12 aminoácidos que fue identificado bajo la visualización de una biblioteca de 109 fagos, y su nombre deriva de los 3 primeros aminoácidos de su extremo N-terminal.⁵⁶

Esta secuencia peptídica posee la capacidad de adsorberse preferentemente a la hidroxiapatita, y así lo determinó *Addison et al.* bajo un ensayo *in vitro*, donde se empleó un pVTK nativo (sin modificaciones) y el péptido con fosforilaciones en un diseño de estudio basado en 4 diferentes discos de apatitas; los resultados demostraron que la fosforilación provocó una mayor adsorción de pVTK a los discos en comparación con el péptido nativo, lo cual permitía suponer un papel inhibitorio del péptido fosforilado.⁵⁶

Para corroborar dicha hipótesis realizaron otro ensayo en cultivo de células similares a osteoblastos y reportaron que pVTK fosforilado tuvo un efecto inhibitorio del 100% en la mineralización al emplearlo en el día 12 de cultivo, lo cual hace suponer que su efecto es en la nucleación y crecimiento cristalino por medio de su absorción a la apatita.⁵⁶

Estos resultados también fueron observados en un estudio de *Montoya et al.*, en el cual emplearon el péptido CAP-pi, correspondiente a los aminoácidos 40-53 del dominio N-terminal de la proteína CAP y su variante fosforilada (CAP-pip) en diferentes ensayos de cristalización de HA y OCD. Sus hallazgos mostraron que la fosforilación presente en el péptido CAP-pip aumentó su potencial inhibitorio en el crecimiento de HA. Además, CAP-pip provocó cambios morfológicos significativos en los cristales, mostrando una estructura característica del OCD.³³

Queda claro que la problemática de enfrentar las calcificaciones ectópicas surge por los diversos mecanismos que pueden ejercer diferentes proteínas y péptidos al interactuar tanto con el componente inorgánico (cristal mineral) como a nivel celular, por lo que es importante conocer las propiedades fisicoquímicas que favorecen o promueven dicha función de estos inhibidores.



Las proteínas no colágenas suelen ser particularmente ácidas, lo que se debe a la preponderancia de los residuos de ácido aspártico y glutámico, así como a los abundantes sitios de fosforilación y glucosilación. La presencia de modificaciones post-traduccionales potencializa la capacidad inhibitoria de una proteína o péptido. Los residuos fosforilados reducen el punto isoeléctrico de la molécula, aumentando así su carga neta negativa para favorecer su interacción con el calcio dentro de la red cristalina, de tal manera que estabiliza los núcleos cristalinos nacientes, o bien adsorbiéndose a las superficies cristalinas en crecimiento.^{55, 56, 81}

Por lo tanto, las proteínas de unión a calcio y/o minerales pueden promover 2 efectos contrarios en la mineralización: promover la nucleación de los cristales mediante el secuestro de los iones de calcio y así ejercer un aumento de las concentraciones locales más allá del punto de estabilización crítico (tamaño del núcleo crítico), o bien, pueden inhibir el crecimiento de los cristales, ya sea mediante la estabilización de los núcleos de los cristales nacientes o de las fases minerales precursoras a través de su adsorción a superficies cristalinas en crecimiento, mecanismo que se comprobó en los estudios de *Addison et al.*⁵⁵ y *Montoya et al.*³³

El análisis fisicoquímico expuesto en la **Tabla IV**, muestra que no hay relación entre el número de aminoácidos ni en el peso molecular respecto al efecto inhibitor, debido a que se han reportado tanto proteínas como péptidos o fragmentos derivados; pero si se tiene demostrado que la presencia de serinas en la secuencia aminoacídica permite predecir sitios de fosforilación, lo cual le generaría una carga más negativa.

Las fosfoserinas pueden unirse a la superficie expuesta del cristal mineral rico en calcio y así modular y/o inhibir su crecimiento. La secuencia completa de OPN en sus diferentes isoformas presenta entre 29-31 sitios de fosforilación, lo que genera un punto isoeléctrico de 4.5, una propiedad fundamental para catalogar a la OPN como un inhibidor por excelencia. Pero incluso, péptidos derivados de OPN poseen un punto isoeléctrico todavía menor, como es el caso del péptido pOPAR (3.58), péptido ASARM (3.3) y P3 (2.98), y que de acuerdo con los datos obtenidos en nuestra revisión, una propiedad en común entre los factores inhibidores es su carácter ácido reflejado por poseer un punto isoeléctrico ≤ 4.8 (punto isoeléctrico máximo reportado en el péptido pVTK fosforilado).



Un planteamiento interesante es si la estructura secundaria de la proteína o péptido tiene un papel relevante en la interacción negativa con el cristal y su crecimiento. Pero en nuestra revisión sólo 2 estudios reportaron información al respecto, lo que genera la perspectiva a futuro de realizar análisis fisicoquímicos más profundos al estudiar una molécula polipeptídica.

Goiko et al. estudiaron 6 péptidos diferentes derivados de MGP y los emplearon en la cristalización de HA y OCD, reportando al péptido YGlapS como el mejor inhibidor tanto la nucleación como en el crecimiento de los depósitos de HA; junto con el fosfopéptido YEpS, fueron los de mejor eficacia en la disminución de formación de depósitos de OCD. Tras el análisis de estructura secundaria de los péptidos, reportaron que YGlapS presentaba en mayor porcentaje una conformación aleatoria (30%), similar a lo reportado con YEpS (36.8% de conformación aleatoria).⁴³

Montoya et al. reportaron los datos más relevantes, el análisis del péptido CAP-pi mostró que presentaba un 85% de conformación aleatoria en su estructura secundaria, mientras que la fosforilación del péptido (CAP-pip) le generaba una conformación aleatoria de 90%.³³ Se tiene reportado que la fosforilación de residuos aminoacídicos no induce un cambio sustancial en la conformación espacial de las moléculas polipeptídicas, pero se ha demostrado que la presencia de fosforilaciones genera repulsiones electrostáticas que podrían incrementar la presencia de estructuras “extendidas” disminuyendo el porcentaje de estructuras α -hélice, lo cual facilitaría la interacción con los minerales.⁵⁹

La hipótesis planteada en el estudio de *Montoya et al.* acerca de la falta de orden en la secuencia peptídica de los péptidos CAP-pi y CAP-pip es que facilita la formación secuencial de enlaces iónicos, debido a la presencia de residuos negativos (aspárticos y glutámicos), generando una mayor interacción molecular péptido-cristal.³³

Por lo que resulta importante llevar a cabo análisis fisicoquímicos a proteínas y péptidos inhibidores para poder predecir la capacidad de interaccionar con cristales en crecimiento. El empleo de moléculas polipeptídicas en la inhibición de la mineralización se justifica plenamente para abrir el panorama de estudio sobre posibles vías de tratamiento de calcificaciones ectópicas y poder cubrir las carencias de otros inhibidores químicos.



El tricloruro de aluminio (AlCl_3) ha sido reportado como un inhibidor de la mineralización en cultivos de osteoblastos al tener un efecto negativo en la formación de nódulos mineralizados en matriz, en la actividad de la fosfatasa alcalina, la concentración de calcio extracelular y la expresión de ARNm de OPN, OC y BSP siendo este último su efecto más potente, pero aún no se conoce su papel en estudios *in vivo*, además de que el aluminio es un metal tóxico acumulativo.⁸²

Otro inhibidor químico es el magnesio (Mg^{2+}), ya que se ha demostrado que previene eficazmente la calcificación vascular asociada a la enfermedad renal crónica. El Mg^{2+} inhibe la formación extracelular de los cristales afectando la interacción calcio-fosfato, lo cual se sugiere es relevante para impulsar la transdiferenciación osteoblástica de las células del músculo liso vascular, por lo cual se tiene bien caracterizado su papel en entorno extracelular, pero aún faltan más estudios para dilucidar si tiene importancia intracelular, principalmente en la diferenciación de células vasculares por entrada a canales de Mg^{2+} .⁸³

Sin embargo, en el ámbito de los inhibidores de la mineralización, los factores más importantes y en pleno estudio son el inositol y el pirofosfato. Por un lado, el hexakisfosfato de inositol (IP6) es un compuesto endógeno altamente fosforilado presente en células y tejidos de mamíferos; el cual, ha sido ampliamente reportado como un potente inhibidor de la mineralización en cultivos de osteoblastos, mediado por su unión a los cristales en crecimiento a través de los grupos de fosfato cargados negativamente y además, y/o sirviendo como una señal específica a nivel celular para la regulación de la expresión del gen de la OPN.⁸⁴

El pirofosfato inorgánico (PPi) es un producto endógeno celular que inhibe la calcificación de tejidos blandos al unirse a los cristales minerales, pero que como otras moléculas duales, se ha demostrado que su hidrólisis mediada por de la fosfatasa alcalina no específica del tejido (Tnap) libera fosfatos que pueden facilitar el crecimiento de los cristales en tejidos como huesos y dientes.¹⁶



En un estudio de *Addison et al.* reportaron que el PPI inhibe la mineralización en cultivos de osteoblastos mediante al menos tres mecanismos diferentes, que incluyen la unión directa a los cristales en crecimiento, la inhibición de la actividad de Tnap y la inducción de la expresión de OPN, lo cual potencia el efecto del PPI.¹⁶

Con toda la información reportada se tiene claro la importancia de las moléculas polipeptídicas en el campo de estudio de los inhibidores, principalmente por la inducción de expresión en células intervenidas por otros factores químicos (punto en común entre el iP6 y PPI), lo cual ha permitido plantear diferentes hipótesis en entornos *in vitro* acerca de mecanismos aún más directos en la interacción proteína y/o péptido-cristal o célula, obteniendo mejores resultados, planteando modificaciones que potencian su efecto, y adicionando los beneficios que conlleva el empleo de biomoléculas.

El siguiente paso es el estudio en entornos *in vivo*, lo cual ha sido un gran reto el emplear proteínas o péptidos en modelo animal. Bajo la búsqueda de artículos se encontraron diversos diseños de estudios *in vivo*, los cuales empleaban la delección génica o análisis de niveles de expresión de ARNm del factor inhibidor, pero bajo nuestros criterios de inclusión no fueron elegidos para su análisis, así como aquellos estudios donde analizaron niveles de calcio y no inhibición de calcificaciones inducidas (descripción de número de artículos excluidos en **FIG 3**).

En nuestra presente revisión incluimos 4 estudios *in vivo*, donde se destaca que en 3 emplearon péptidos: *Cai et al.* (intermedina)⁵³, *Wang et al.* (ghrelina)⁴⁹ y *Chen et al.* (péptido natriurético C)⁴⁰, esto se puede deber a las ventajas que ofrece el empleo de péptidos comparadas con las proteínas. Por ejemplo, la rapidez en la fabricación de péptidos sintéticos y los beneficios inmediatos que resultan cuando las moléculas mantienen su actividad, además, al ser secuencias cortas no poseen estructura tridimensional lo cual le brinda mayor estabilidad físico-química, se pueden emplear en altas concentraciones, debido a su peso molecular es poco probable que puedan inducir una respuesta del sistema inmunológico.⁸⁵



De acuerdo a los estudios *in vivo*, las secuencias peptídicas empleadas demostraron poseer la capacidad de regular la deposición de calcio^{40,49,53,61}, la actividad de ALP^{40,53}, así como el aumentó en el nivel de expresión de ARNm de OPN⁴⁹, lo que resulta relevante, porque permite deducir que dichos factores inhibidores actúan en las primeras etapas del proceso de mineralización tanto a nivel mineral, como a nivel celular al inducir de manera secundaria la expresión de otros inhibidores.

Con las diversas metodologías y resultados observados en ensayos *in vitro*, se tiene la necesidad de seguir investigando el empleo de péptidos y proteínas en modelos animales para estudiar su papel inhibidor en un entorno con múltiples variables, así como determinar la interacción sérica o las concentraciones óptimas para una efectividad inhibidora en la zona de calcificaciones y así, en un futuro poder diseñar ensayos clínicos para dilucidar los posibles enfoques terapéuticos para el tratamiento de calcificaciones ectópicas de manera segura y eficiente.

10. CONCLUSIONES

El campo de investigación acerca de las moléculas polipeptídicas y su efecto inhibidor en la mineralización lleva más de 30 años aportando información en diferentes partes del mundo, permitiendo establecer metodologías eficientes y obteniendo resultados favorables.

Actualmente la molécula polipeptídica más estudiada es la OPN, al presentar un efecto significativo en la inhibición de la mineralización *in vitro*, y ha sido empleada en sus diferentes isoformas o con péptidos derivados de su secuencia, mostrando resultados similares, e incluso más efectivos comparado con el empleo de la proteína total.

Los análisis y resultados obtenidos con el empleo de proteínas y/o péptidos en estudios *in vitro* demostraron que las principales características fisicoquímicas que poseen estos inhibidores de la mineralización es la presencia de residuos particularmente ácidos (aspartato y glutamato) en su secuencia; además, de la importancia de modificaciones post-traduccionales, esto es, regiones susceptibles a fosforilaciones (principalmente sitios de serinas) lo cual potencializa su capacidad inhibitoria al aumentar la carga neta negativa.



Por otro lado, es necesario llevar a cabo más estudios para determinar si la estructura secundaria influye de manera trascendente en el potencial inhibidor.

A pesar de todos los hallazgos reportados, aún falta realizar más estudios *in vivo* que permitan elucidar el mecanismo tisular y fisiológico exacto de las proteínas o péptidos inhibidores de la mineralización, ya que nos arrojará información acerca de la eficacia y seguridad de su empleo en posibles tratamientos de calcificaciones ectópicas.

11. REFERENCIAS

1. Carranza FA, Neuman MG. 2012. Clinical periodontology. 11th Edition. Saunders Company. USA.
2. Lindhe J. 2012. Periodontología Clínica e Implantología odontológica: conceptos básicos. 6ª Edición. Tomo 1. En: Lang P. Editorial Médica panamericana. España.
3. Almaguer A, Villagómez JG. (2018) Ecología Oral. Edit. Manual Moderno. México. Pp 15-20.
4. Azzopardi PV, O'Young J, Lajoie G, Karttunen M, Goldberg HA, Hunter GK. 2010. Roles of electrostatics and conformation in protein-crystal interactions. PLoS One 19;5(2).
5. García-Garduño M, Reyes-Gazca J. 2006. La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 9(2):90-95.
6. Beniash E. 2011. Biominerals—hierarchical nanocomposites: the example of bone. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 3:47–69.
7. Boonrungsiman S, Gentleman E, Carzaniga R, Evans ND, McComb DW, Porter AE, Stevens MM. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Aug 28;109(35):14170-5.
8. Evrard S, Delanaye P, Kamel S, Cristol JP, Cavalier E. 2015. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. Clinica Chimica Acta 438. Pp 401-4014.
9. Piera-Velazquez, S., Jimenez, S.A., 2019. Endothelial to mesenchymal transition: role in physiology and in the pathogenesis of human diseases. Physiol. Rev. 99, 1281–1324.
10. Quaglino D, Boraldi F, Lofaro F. 2020. The biology of vascular calcification. International Review of Cell and Molecular Biology, Chapter 8, Volume 354, Elsevier Inc 251-353.
11. Dellavalle, A., Maroli, G., Covarello, D., Azzoni, E., Innocenzi, A., Perani, L., Antonini, S., Sambasivan, R., Brunelli, S., Tajbakhsh, S., Cossu, G. 2011. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. Nat. Commun. 2, 499.
12. Demer, L.L., Tintut, Y. 2014. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 34, 715–723.
13. Rimer J, Kolbach-Mandel A, Ward M, Wesson J. 2016. The role of macromolecules in the formation of kidney stones. Springer (Urolithiasis): 45. P.p. 57-74.
14. Wesson JA, Ward MD. 2007. Pathological biomineralization of kidney stones. Elements: 3. p.p. 415–421.



15. Grohe B. 2017. Synthetic peptides derived from salivary proteins and the control of surface charge densities of dental surfaces improve the inhibition of dental calculus formation. *Materials Science and Engineering*: 77. P.P. 58-68.
16. Addison W, Azari F, Esben S, Sørensen S, Kaartinen T, McKee M. 2007. Pyrophosphate Inhibits Mineralization of Osteoblast Cultures by Binding to Mineral, Up-regulating Osteopontin, and Inhibiting Alkaline Phosphatase Activity. *The journal of biological chemistry* vol. 282, no. 21, pp. 15872–15883.
17. Bradshaw, A.D. 2012. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 480–488.
18. Moe, S.M., Chen, N.X., 2004. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ. Res.* 95, 560–567.
19. Termine, J.D., Kleinman, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L., Martin, G.R., 1981. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26, 99–105.
20. Hruska, K.A., Mathew, S., Saab, G., 2005. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ. Res.* 97, 105–114.
21. Christensen, B., Kazanekci, C.C., Petersen, T.E., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Sørensen, E.S., 2007. Cell type-specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties. *J. Biol. Chem.* 282, 19463–19472.
22. Icer, M.A., Gezmen-Karadag, M., 2018. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin. Biochem.* 59, 17–24.
23. Hauschka, P.V., Lian, J.B., Cole, D.E., Gundberg, C.M., 1989. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol. Rev.* 69, 990–1047.
24. Addison WN, Nakano Y, Loisel T, Crine P, McKee MD. 2008. MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *J Bone Miner Res*; 23(10):1638–49.
25. Fisher LW, Fedarko NS. 2003. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res*; 44 (Suppl 1):33–40.
26. Liu S, Rowe PS, Vierthaler L, Zhou J, Quarles LD. 2007. Phosphorylated acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome enzyme activity. *J Endocrinol*; 192(1):261–7.
27. Rowe PS, de Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ, Oudet CL. 2000. MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics*; 67(1):54–68.
28. Christensen B, Schytte GN, Scavenius C, Enghild JJ, McKee MD, Sørensen ES. 2020. FAM20C-Mediated Phosphorylation of MEPE and Its Acidic Serine- and Aspartate-Rich Motif. *JBMR Plus*; 4(8):e10378.
29. Hunter GK, Grohe B, Jeffrey S, O'Young J, Sørensen ES, Goldberg HA. 2009. Role of phosphate groups in inhibition of calcium oxalate crystal growth by osteopontin. *Cells Tissues Organs*; 189(1-4):44-50.
30. Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler WT, Sorensen ES. 2005. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int*;77(1):45– 54.
31. Iline-Vul T, Nanda R, Mateos B, Hazan S, Matlahov I, Perelshtein I, Keinan-Adamsky K, Althoff-Ospelt G, Konrat R, Goobes G. 2020. Osteopontin regulates biomimetic calcium phosphate crystallization from disordered mineral layers covering apatite crystallites. *Sci Rep*; 10(1):15722.



32. Kazanecki CC, Uzwiak DJ, Denhardt DT. 2007. Control of osteopontin signaling and function by posttranslational phosphorylation and protein folding. *Journal of Cellular Biochemistry* 102:912–924.
33. Montoya G, Lopez K, Arenas J, Zamora C, Hoz L, Romo E, Jiménez K, Arzate H. 2020. Nucleation and growth inhibition of biological minerals by cementum attachment protein-derived peptide (CAP-pi). *J Pept Sci. Dec*;26(12):e3282.
34. Zhang Q, Chen S, Shi J, Li F, Shi X, Hu X, Deng C, Shi F, Han G, Dong N. 2019. Coupled OPG-Fc on Decellularized Aortic Valves by EDC/NHS Attenuates Rat MSCs Calcification In Vitro. *ASAIO J*; 65(2):197-204.
35. Ponnusamy A, Sinha S, Hyde GD, Borland SJ, Taylor RF, Pond E, Eyre HJ, Inkson CA, Gilmore A, Ashton N, Kalra PA, Canfield AE. 2018. FTI-277 inhibits smooth muscle cell calcification by up-regulating PI3K/Akt signaling and inhibiting apoptosis. *PLoS One*; 13(4):e0196232.
36. Hoac B, Nelea V, Jiang W, Kaartinen MT, McKee MD. 2017. Mineralization-inhibiting effects of transglutaminase-crosslinked polymeric osteopontin. *Bone*; 101:37-48.
37. Cao F, Liu X, Cao X, Wang S, Fu K, Zhao Y, Shen F, Liu J. 2017. Fibroblast growth factor 21 plays an inhibitory role in vascular calcification in vitro through OPG/RANKL system. *Biochem Biophys Res Commun*; 23;491(3):578-586.
38. Xiao Y, Karttunen M, Jalkanen J, Mussi MC, Liao Y, Grohe B, Laguné-Labarthe F, Siqueira WL. 2015. Hydroxyapatite Growth Inhibition Effect of Pellicle Statherin Peptides. *J Dent Res*; 94(8):1106-12.
39. Ramaswamy J, Nam HK, Ramaraju H, Hatch NE, Kohn DH. 2015. Inhibition of osteoblast mineralization by phosphorylated phage-derived apatite-specific peptide. *Biomaterials*; 73:120-30.
40. Chen JJ, Zhang J, Cai Y, Zhou YB, Wen GB, Tang CS, Qi YF, Jiang ZS. 2014. C-type natriuretic peptide inhibiting vascular calcification might involve decreasing bone morphogenic protein 2 and osteopontin levels. *Mol Cell Biochem*; 392(1-2):65-76.
41. de Bruyn JR, Goiko M, Mozaffari M, Bator D, Dauphinee RL, Liao Y, Flemming RL, Bramble MS, Hunter GK, Goldberg HA. 2013. Dynamic light scattering study of inhibition of nucleation and growth of hydroxyapatite crystals by osteopontin. *PLoS One*; 8(2):e56764.
42. Alves, R. D. A. M., Eijken, M., Bezstarosti, K., Demmers, J. A. A., & Van Leeuwen, J. P. T. M. 2013. Activin a suppresses osteoblast mineralization capacity by altering extracellular matrix (ECM) composition and impairing matrix vesicle (MV) production. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(10), 2890-2900.
43. Goiko M, Dierolf J, Gleberzon JS, Liao Y, Grohe B, Goldberg HA, de Bruyn JR, Hunter GK. 2013. Peptides of Matrix Gla protein inhibit nucleation and growth of hydroxyapatite and calcium oxalate monohydrate crystals. *PLoS One*; 8(11):e80344.
44. Boskey AL, Christensen B, Taleb H, Sørensen ES. 2012. Post-translational modification of osteopontin: effects on in vitro hydroxyapatite formation and growth. *Biochem Biophys Res Commun*; 419(2):333-8.
45. Chan BP, Vincent K, Lajoie GA, Goldberg HA, Grohe B, Hunter GK. 2012. On the catalysis of calcium oxalate dihydrate formation by osteopontin peptides. *Colloids Surf B Biointerfaces*; 96:22-8.
46. Grohe B, Hug S, Langdon A, Jalkanen J, Rogers KA, Goldberg HA, Karttunen M, Hunter GK. 2012. Mimicking the biomolecular control of calcium oxalate monohydrate crystal growth: effect of contiguous glutamic acids. *Langmuir*; 28(33):12182-90.



47. O'Young J, Liao Y, Xiao Y, Jalkanen J, Lajoie G, Karttunen M, Goldberg HA, Hunter GK. 2011. Matrix Gla protein inhibits ectopic calcification by a direct interaction with hydroxyapatite crystals. *J Am Chem Soc*; 133(45):18406-12.
48. Grohe B, Chan BP, Sørensen ES, Lajoie G, Goldberg HA, Hunter GK. 2011. Cooperation of phosphates and carboxylates controls calcium oxalate crystallization in ultrafiltered urine. *Urol Res*; 39(5):327-38.
49. Wang F, Jiang T, Tang C, Su Z, Zhang N, Li G. 2011. Ghrelin reduces rat myocardial calcification induced by nicotine and vitamin D3 in vivo. *Int J Mol Med*; 28(4):513-9.
50. Atkins, G. J., Rowe, P. S., Lim, H. P., Welldon, K. J., Ormsby, R., Wijenayaka, A. R., Findlay, D. M. 2011. Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/preosteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM-dependent mechanism. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(7), 1425-1436.
51. Thurgood LA, Sørensen ES, Ryall RL. 2012. The effect of intracrystalline and surface-bound osteopontin on the degradation and dissolution of calcium oxalate dihydrate crystals in MDCKII cells. *Urol Res*; 40(1):1-15.
52. Boskey, A. L., Chiang, P., Fermanis, A., Brown, J., Taleb, H., David, V., & Rowe, P. S. N. 2010. MEPE's diverse effects on mineralization. *Calcified Tissue International*, 86(1), 42-46.
53. Cai Y, Xu MJ, Teng X, Zhou YB, Chen L, Zhu Y, Wang X, Tang CS, Qi YF. 2010. Intermedin inhibits vascular calcification by increasing the level of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein. *Cardiovasc Res*; 85(4):864-73.
54. Silverman LD, Saadia M, Ishal JS, Tishbi N, Leiderman E, Kuyunov I, Recca B, Reitblat C, Viswanathan R. 2010. Hydroxyapatite growth inhibition by osteopontin hexapeptide sequences. *Langmuir*; 26(12):9899-904.
55. Addison WN, Masica DL, Gray JJ, McKee MD. 2010. Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *J Bone Miner Res*; 25(4):695-705.
56. Addison WN, Miller SJ, Ramaswamy J, Mansouri A, Kohn DH, McKee MD. 2010. Phosphorylation-dependent mineral-type specificity for apatite-binding peptide sequences. *Biomaterials*; 31(36):9422-30.
57. Luo XH, Zhao LL, Yuan LQ, Wang M, Xie H, Liao EY. 2009. Development of arterial calcification in adiponectin-deficient mice: adiponectin regulates arterial calcification. *J Bone Miner Res*; 24(8):1461-8.
58. Langdon A, Wignall GR, Rogers K, Sørensen ES, Denstedt J, Grohe B, Goldberg HA, Hunter GK. 2009. Kinetics of calcium oxalate crystal growth in the presence of osteopontin isoforms: an analysis by scanning confocal interference microscopy. *Calcif Tissue Int*; 84(3):240-8.
59. Grohe B, O'Young J, Ionescu DA, Lajoie G, Rogers KA, Karttunen M, Goldberg HA, Hunter GK. 2007. Control of calcium oxalate crystal growth by face-specific adsorption of an osteopontin phosphopeptide. *J Am Chem Soc*; 129(48):14946-51.
60. Moe SM, Reslerova M, Ketteler M, O'neill K, Duan D, Koczman J, Westenfeld R, Jahnen-Dechent W, Chen NX. 2005. Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int*; 67(6):2295-304.
61. Ohri R, Tung E, Rajachar R, Giachelli CM. 2005. Mitigation of ectopic calcification in osteopontin-deficient mice by exogenous osteopontin. *Calcif Tissue Int*; 76(4):307-15.
62. Pampena, D. A., Robertson, K. A., Litvinova, O., Lajoie, G., Goldberg, H. A., & Hunter, G. K. 2004. Inhibition of hydroxyapatite formation by osteopontin phosphopeptides. *Biochemical Journal*, 378(3), 1083-1087.



63. Rowe PS, Kumagai Y, Gutierrez G, Garrett IR, Blacher R, Rosen D, Cundy J, Navvab S, Chen D, Drezner MK, Quarles LD, Mundy GR. 2004. MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and inhibitor. *Bone*; 34(2):303-19.
64. Zhao M, Berry JE, Somerman MJ. 2003. Bone morphogenetic protein-2 inhibits differentiation and mineralization of cementoblasts in vitro. *J Dent Res*; 82(1):23-7.
65. Price PA, Lim JE. 2003. The inhibition of calcium phosphate precipitation by fetuin is accompanied by the formation of a fetuin-mineral complex. *J Biol Chem*; 278(24):22144-52.
66. Gopalakrishnan R, Ouyang H, Somerman MJ, McCauley LK, Franceschi RT. 2001. Matrix gamma-carboxyglutamic acid protein is a key regulator of PTH-mediated inhibition of mineralization in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Endocrinology*; 142(10):4379-88.
67. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. 2000. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem*; 275(26):20197-203.
68. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. 1999. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res*; 84(2):166-78.
69. Ikenoue T, Jingushi S, Urabe K, Okazaki K, Iwamoto Y. 1999. Inhibitory effects of activin-A on osteoblast differentiation during cultures of fetal rat calvarial cells. *J Cell Biochem*; 75(2):206-14.
70. Hsieh SC, Graves DT. 1998. Pulse application of platelet-derived growth factor enhances formation of a mineralizing matrix while continuous application is inhibitory. *J Cell Biochem*; 69(2):169-80.
71. Hiruma Y, Inoue A, Shiohama A, Otsuka E, Hirose S, Yamaguchi A, Hagiwara H. 1998. Endothelins inhibit mineralization of rat calvarial osteoblast-like cells. *J Cardiovasc Pharmacol*; 31 Suppl 1:S521-3.
72. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. 1996. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J*; 317 (Pt 1):59-64.
73. Talley-Ronsholdt DJ, Lajiness E, Nagodawithana K. 1995. Transforming growth factor-beta inhibition of mineralization by neonatal rat osteoblasts in monolayer and collagen gel culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*; 31(4):274-82.
74. Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. 1994 Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J*; 300 (Pt 3):723-8.
75. Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. 1993. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner*; 22(2):147-59.
76. Doi Y, Okuda R, Takezawa Y, Shibata S, Moriwaki Y, Wakamatsu N, Shimizu N, Moriyama K, Shimokawa H. 1989. Osteonectin inhibiting de novo formation of apatite in the presence of collagen. *Calcif Tissue Int*; 44(3):200-8.
77. Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, Desjardins LA, Heeley JD. 1987. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J Bone Miner Res*; 2(6):559-65.
78. Grohe B, Taller A, Vincent PL, Tieu LD, Rogers KA, Heiss A, Sørensen ES, Mittler S, Goldberg HA, Hunter GK. 2009. Crystallization of calcium oxalates is controlled by molecular hydrophilicity and specific polyanion-crystal interactions. *Langmuir*; 25(19):11635-46.



79. Langdon A, Grohe B. 2016. The osteopontin-controlled switching of calcium oxalate monohydrate morphologies in artificial urine provides insights into the formation of papillary kidney stones. *Colloids Surf B Biointerfaces*; 146:296-306.
80. Montoya, G. tesis. 2015. Estudio de cristales inducidos con el péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) en un sistema libre de células. Universidad Nacional Autónoma de México DdEdPel.
81. Zappone B, Thurner PJ, Adams J, Fantner GE, Hansma PK. 2008. Effect of Ca²⁺ ions on the adhesion and mechanical properties of adsorbed layers of human osteopontin. *Biophysical Journal* 95:2939–2950.
82. Song M, Huo H, Cao Z, Han Y, Gao L. 2017. Aluminum Trichloride Inhibits the Rat Osteoblasts Mineralization In Vitro. *Biol Trace Elem Res*; 175(1):186-193.
83. Ter Braake AD, Tinnemans PT, Shanahan CM, Hoenderop JGJ, de Baaij JHF. 2018. Magnesium prevents vascular calcification in vitro by inhibition of hydroxyapatite crystal formation. *Sci Rep*; 8(1):2069.
84. Addison WN, McKee MD. 2010. Inositol hexakisphosphate inhibits mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Bone*; 46(4):1100-7.
85. Doti N, Mardirossian M, Sandomenico A, Ruvo M, Caporale A. Recent Applications of Retro-Inverso Peptides. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 12;22(16):8677.