



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

CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITA FUNCIONALIZADA CON EL
PÉPTIDO DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO
(pHACD1/CAP).

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

PRESENTA:
JULIO ADRIÁN HERNÁNDEZ ZORRILLA

TUTORES
DR. ENRIQUE ROMO ARÉVALO
DR. ERIC MAURICIO RIVERA MUÑOZ
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA
SALUD

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN206420

Al Dr. Enrique Romo por la guía y apoyo en esta etapa, gracias, por tanto, perdón por tan poco.

Al Dr. Eric Rivera por compartir su conocimiento y brindarnos todas las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Rodrigo Correa que, sin usted simplemente este trabajo no hubiera podido salir a flote, gracias por su tiempo y apoyo.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Argelia Almaguer y el Dr Eric rivera por los consejos atención brindados a este trabajo.

Al Dr. Mikado Nidome por su apoyo en la realización del modelo *in silico*.

Al Laboratorio nacional de Caracterización de materiales (LaNCaM), por las facilidades en las técnicas de caracterización microestructural y de composición elemental.

A la Dra. Beatriz M. Millán Malo por el apoyo técnico en DRX.

A la Dra. Carmen Peza Ledesma por su apoyo técnico en las espectroscopías y de caracterización elemental.

Al M. en C. Manuel Aguilar Franco por su apoyo técnico en SEM.

A todos los miembros del laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados que me abrieron las puertas y siempre tuvieron la mejor disposición para ayudarme.

Al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA)

A la UNAM por abrirme las puertas desde los 11 años y seguir haciéndolo

A los revisores de Tesis, Dra. Lia Hoz, Dr. Jesus Arenas, Dr, Luis Felipe Jiménez y al Dr. Daniel Fernández, por su observaciones, tiempo y enseñanzas.

Dedicatorias

A mis papás, Elizabeth y Roberto por todo el sacrificio, enseñanzas, comprensión y miles de cosas más. Eternamente agradecido.

A mis hermanos Bere, Héctor y Fátima por siempre apoyarme

A toda mi familia, los que están y los que se fueron, de alguna forma de todos aprendo algo.

Al Dr. Arturo Ortega Salgado, por su amistad y ejemplo para seguir haciendo cosas.

A los amigos de toda la vida que siguen conmigo, Davidu, Prax, Carmen, Gus, Will, Tercero, Mane, Vic, Armando, Carmen, Violeta, Emmanuel el foráneo, Juanpi, Roules, los quiero.

A mis compañeros de generación: Isa, Lis, Pavel, Fer y Beto, sin duda no pude tener mejores compañeros y amigos en esta aventura.

A Diana por el apoyo y comprensión estos dos años

“En la vida nos pensamos que la gloria es el dinero, pero nos equivocamos, nuestra gente es lo primero”. “El madrileño”

ÍNDICE

Abreviaturas	i
Resumen	iii
Abstract	v
1. Introducción	1
2. Marco Teórico.....	4
2.1. Tejido óseo.....	4
2.1.1. Células residentes del tejido óseo	4
2.1.2. Matriz Ósea	7
2.1.3. Tipos de tejido óseo.	9
2.2. Biomateriales	12
2.2.1. Metálicos	13
2.2.2. Cerámicos	14
2.2.3. Polímeros	14
2.2.4. Compuestos (mezcla de dos o más)	15
2.3. Hidroxiapatita	16
2.5. Péptidos usados en regeneración ósea	18
3. Planteamiento del problema.....	26
4. Justificación.....	26
5. Hipótesis.....	26
6. Objetivos	27
6.1. General.....	27
6.2. Objetivos específicos	27
7. Metodología.....	28
7.1. Síntesis de pHACD1/CAP.....	28
7.2. Diseño y fabricación de los moldes para elaborar hidroxiapatita	28
7.3. Elaboración de la fase inorgánica del proceso de Gel casting modificado (PGCM).....	30

7.4. Adición del péptido de HACD1/CAP	33
7.5. Elaboración de Fase orgánica del proceso de Gel casting modificado..	33
7.6. Técnicas de caracterización	34
7.6.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	34
7.6.2. Espectroscopía por Dispersión de Energía de rayos X (EDS)	34
7.6.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	34
7.6.4. Espectroscopía Raman.....	35
7.6.5. Difracción de rayos X (XRD)	36
7.7. Modelo <i>in silico</i> de docking molecular entre hidroxiapatita y pHACD1/CAP.....	36
8. Resultados.....	38
8.1. Obtención de muestras	38
8.2. Microscopía electrónica de barrido	39
8.2.2. PEMA y PMMA.....	39
8.2.3. PBMA y PMMA.....	41
8.2.4. PMMA.....	42
8.3.4. Hidroxiapatita adicionada con péptido	43
8.4. EDS.....	44
8.5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	45
8.6. Espectroscopía RAMAN.....	50
8.6.1. HA con grenetina.....	50
8.6.2. HA con pHACD1/CAP	51
8.7. Difracción de rayos X (XRD)	53
8.8. Modelo <i>in silico</i>	55
8.8.1. Cristal de hidroxiapatita	55
8.8.2. Modelo de pHACD1/CAP	56
8.8.3. Docking molecular entre hidroxiapatita y pHACD1/CAP	57

9.	Discusión	60
10.	Conclusiones	64
11.	Perspectivas	64
12.	Bibliografía.....	66

Abreviaturas

HA	Hidroxiapatita
µm	Micrómetros
Ac. Ox	Ácido oxálico
AG	Aparato de Golgi
APA	Ácido poliacrílico
BGP	Proteína gla ósea
BMP	Proteína morfogénica ósea
CaP	Fosfato de calcio
C-terminal	Carboxilo terminal
EDS	Espectroscopía por dispersión de energía de rayos X
Etanol	EtOH
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GAG	Glucosaminoglicanos
HSC	Hematopoyetic Stem Cells/células troncales hematopoyéticas
MGP	Proteína Gla de la Matriz
MSC	Mesenchymal Stem Cells/células troncales mesenquimales
PBMA	Polibutimetacrilato
PEG	Polietilen glicol
PEMA	Polietilmetacrilato
PGCM	Proceso gel-casting modificado
pHACD1/CAP	Péptido de 15 aminoácidos de HACD1/CAP
PLA	Ácido poliláctico
PMMA	Polimetilmetracrilato
PVB	Polivinil butiral
RER	Retículo endoplásmico rugoso
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

XRD	Difracción de rayos X
XRF	Fluorescencia de rayos X

Resumen

En el presente trabajo se demuestra la interacción entre el péptido sintético derivado del extremo carboxilo terminal de la proteína de adhesión del cemento (pHACD1/CAP) con andamios porosos de hidroxiapatita sintetizados por el proceso de gel-casting modificado. El péptido pHACD1/CAP ha demostrado su capacidad para inducir la formación de cristales de hidroxiapatita en un sistema libre de células, así como estimular el proceso de regeneración de tejidos mineralizados en modelos de defectos óseos de tamaño crítico en calvarias de rata y tibias de conejo. Además, promueve la regeneración periodontal que, incluye regeneración de ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar en defectos periodontales inducidos en ratas wistar, esto lo convierte en un potencial agente terapéutico en el tratamiento de defectos óseos y periodontales. Por otra parte, el proceso gel-casting modificado (PGCM) permite modelar andamios de hidroxiapatita (HA) sintética a la forma deseada y regular su microporosidad.

La principal desventaja de todos los injertos aloplásticos o sintéticos para regeneración ósea, es el carecer de biomoléculas osteoinductoras. Por lo que, añadir una molécula osteoinductora como lo es el pHACD1/CAP al PGCM y estudiar su interacción, es el primer paso para el posible mejoramiento de los tratamientos de regeneración ósea en el futuro.

La caracterización del material compuesto (andamio de hidroxiapatita adicionado con el pHACD1/CAP) se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía Raman, espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDS) y análisis de difracción de rayos X (DRX). Estas diferentes técnicas nos permitieron recabar información importante del material obtenido (características físicas del material e interacción entre el péptido hacia la hidroxiapatita). Finalmente, realizamos una propuesta teórica mediante docking molecular, de la interacción atómica entre el péptido y la HA.

Nuestros resultados nos permiten concluir que pHACD1/CAP tiene interacción química con el andamio de HA, mediante FTIR identificamos un grupo de bandas entre 1881 y 1390 cm^{-1} que indican la presencia de enlaces amida y amina presentes en los aminoácidos que, demuestran que el péptido puede permanecer en el material. Mediante el docking molecular identificamos que las serinas presentes en el péptido son las que dirigen dicha interacción.

Abstract

In the present work, we demonstrated the interaction between the carboxyl terminal cementum attachment protein derived peptide (pHACD1/CAP) with porous hydroxyapatite (HA) scaffolds synthesized by the modified gel-casting process (MGCP). The pHACD1/CAP has demonstrated its ability to induce the formation of hydroxyapatite crystals in a cell-free system, as well as to stimulate the regeneration of bone defects in rat calvaria and rabbit tibia critical size models. In addition, it promotes periodontal regeneration including regeneration of the periodontal ligament, root cementum and alveolar bone in induced periodontal defects in wistar rats. These evidences make pHACD1/CAP a potential therapeutic agent in the treatment of bone and periodontal defects. On the other hand, the MGCP, allows modeling synthetic hydroxyapatite scaffolds to the desired shape and regulating their microporosity.

The main disadvantage of all alloplastic or synthetic grafts for bone regeneration is the lack of osteoinductive biomolecules. Therefore, adding an osteoinductive molecule such as pHACD1/CAP to HA made with PGCM and studying its interaction is the first step for the possible improvement of bone regeneration treatments in the future.

The characterization of the composite material (hydroxyapatite scaffold added with pHACD1/CAP) was performed by means of scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy, Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and X-ray diffraction (XRD). These different techniques allowed us to collect important information on the material obtained (physical characteristics and interaction between the peptide and hydroxyapatite). Finally, we make a theoretical proposal through molecular docking, of the atomic interaction between the peptide and HA.

Our results allow us to conclude that pHACD1/CAP has a chemical interaction with the HA scaffold, by means of FTIR we identified a group of bands between 1881 and 1390 cm^{-1} that indicate the presence of amide and amine bonds present in the amino acids, which demonstrates that peptide

may remain in the material. Through molecular docking we identify that the serines present in the peptide are the ones that direct this interaction.

1. Introducción

En condiciones adecuadas de salud el tejido óseo posee la capacidad intrínseca de regenerarse por completo, esta capacidad se puede ver comprometida por diferentes factores como: enfermedades subyacentes, vascularización deficiente, el proceso de envejecimiento o cuando la lesión es tan grande que excede la capacidad del tejido de regenerarse (Bullock et al., 2021). Los defectos óseos pueden ser causados por distintas situaciones tales como lesiones por traumatismos, infecciones y tumores óseos, entre otros. Suelen requerir una resección de tejido óseo grande, lo que provoca un defecto óseo de tamaño crítico (aquel que no puede regenerar a pesar de la estabilización quirúrgica y requiere de una intervención adicional para colocar un injerto óseo) (Keating et al., 2005). Es difícil determinar las dimensiones que debe de tener un defecto de tamaño crítico, sin embargo, se ha descrito que deben tener una longitud mayor a 1-2 cm y una pérdida de más del 50 % de la circunferencia del hueso en humanos (Sanders et al., 2014).

Para la regeneración de los defectos óseos se han empleado diferentes biomateriales, entre estos se utiliza hidroxapatita (HA), ya que es el mayor componente inorgánico de los tejidos mineralizados del cuerpo humano (hueso, cemento radicular, dentina y esmalte) (Campa, J, Rivera-Muñoz, 2007). Es por esta razón que, se ha utilizado ampliamente como injerto para promover la regeneración ósea. Para llevar a cabo la regeneración ósea se requieren diferentes mecanismos biológicos que son: la osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis. La osteoconducción se refiere a la formación ósea, mediante osteoblastos que se encuentran en márgenes del defecto, en el material de injerto óseo. Los materiales osteoconductivos sirven como andamio para el crecimiento óseo, estos no inhiben ni inducen la formación ósea. La osteoinducción incluye la formación de hueso nuevo al estimular células osteoprogenitoras dentro del defecto o de los espacios paravasculares para que se diferencien en osteoblastos y comiencen la formación de tejido óseo. Existen diferentes moléculas osteoinductoras, como es el caso de las proteínas morfogénicas óseas (BMP's), el factor de crecimiento vascular (VEGF), la proteína del cemento 1 (CEMP-1) y la

proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP), entre otras. La osteogénesis se lleva a cabo cuando los osteoblastos son parte del injerto, en donde éstos comienzan nuevos centros de osificación dentro del injerto, para esto requieren un adecuado aporte sanguíneo y viabilidad celular

Los injertos para regeneración ósea se pueden dividir de acuerdo con la fuente de la cual son obtenidos:

- Autoinjertos.

Es el estándar de oro ya que se obtiene del mismo paciente, pero de otra región anatómica (cresta iliaca, rama de la mandíbula, mentón, entre otros) (Chavda & Levin, 2018). Al tomarlo del mismo paciente posee osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis adecuadas, además de tener menor riesgo de rechazo inmunitario y de infección (García-Gareta et al., 2015; Trujillo et al., 2014; Martínez Álvarez et al., 2018). Entre sus desventajas está la necesidad de dos sitios quirúrgicos, además de la cantidad limitada que se puede obtener y la utilización de alguno de los otros tipos de injertos para el sitio donador (Chavda & Levin, 2018).

- Aloinjertos (tejido óseo tomado de otro individuo de la misma especie).

Estos injertos tienen como desventajas: ocasionar diversas reacciones de rechazo inmunológico, así como un alto riesgo de infección. Además, al ser sometidos a procesos de esterilización se eliminan células y moléculas esto provoca que no posea osteogénesis y su osteoinducción sea reducida (Chavda & Levin, 2018; García-Gareta et al., 2015; Trujillo et al., 2014; Martínez Álvarez et al., 2018).

- Xenoinjertos (tejido óseo tomado de un individuo de distinta especie).

Principalmente son de origen equino, porcino o bovino. Al igual que los aloinjertos pueden ocasionar rechazo e infección en el paciente receptor y carecen de osteoinducción y osteogénesis (Chavda & Levin, 2018).

- Injertos aloplásticos (injertos sintéticos)

Actualmente los materiales aloplásticos son una gran alternativa debido a que pueden sintetizarse con diferentes formas, tamaños de poro y topografías que le pueden proporcionar una adecuada osteoconducción (García-Gareta et al., 2015) sin embargo, su capacidad osteoinductora es muy baja, lo que resulta en tratamientos de larga duración y con resultados poco predecibles (Chan et al., 2012; Ripamonti, 1996).

Con el fin de restablecer la función de órganos y tejidos se ha desarrollado el campo de la ingeniería de tejidos, que tiene como pilares el uso de andamios, poblaciones celulares determinadas y moléculas inductoras. Se ha propuesto que, para mejorar estos injertos óseos sintéticos se pueden añadir diferentes moléculas osteoinductoras tales como proteínas, péptidos o factores de crecimiento, que posean la capacidad de fomentar la regeneración ósea y permitan potenciar la capacidad osteogénica de los materiales sintéticos y así obtener mejores resultados en cuanto a la formación de tejido nuevo (Acharya et al., 2012; Chavda & Levin, 2018).

2. Marco Teórico

2.1. Tejido óseo

El tejido óseo es la unidad básica del sistema esquelético humano. Es un tejido complejo y dinámico, esto porque se encuentra en un constante recambio, llamado remodelado óseo, (Bhat & Kumar, 2013a; Eliaz & Metoki, 2017). Está formado por un 15 % de agua, 30 % de fibras de colágena y 55% de minerales cristalizados (principalmente HA). Entre sus funciones están(Tortora James & Derrickson Bryan, 2018):

- **Sostén.** El esqueleto es el almacén estructural del cuerpo que sirve de sostén para tejidos blandos, inserción de tendones de los músculos esqueléticos.
- **Protección.** Protege a los órganos vitales (cerebro, corazón, pulmones, etc.)
- **Asistencia al movimiento.** Los músculos se insertan en el esqueleto para permitir la locomoción del cuerpo.
- **Homeostasis mineral.** Almacena minerales como calcio y fósforo que son necesarios para su solidez y muchos procesos metabólicos, estos pueden ser liberados para distribuirse a todo el cuerpo.
- **Producción de células sanguíneas.** Algunos huesos poseen médula ósea roja, la cual produce eritrocitos, leucocitos y plaquetas, mediante la hematopoyesis.
- **Depósito de triglicéridos.** En la médula ósea amarilla se encuentran principalmente células adiposas que permiten el almacenamiento de triglicéridos, los cuales son una fuente de energía química.

2.1.1. Células residentes del tejido óseo

El tejido óseo es un constructo complejo en el cual están presentes diferentes tipos celulares, las cuales llevan a cabo funciones específicas que permiten el adecuado funcionamiento del tejido, entre estas se encuentran:

2.1.1.1. Células osteoprogenitoras

Entre estas se destacan dos tipos de células troncales: las células troncales hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) y las células troncales mesenquimales (MSC). Las HSC y MSC se encuentran en la médula ósea

y vasos sanguíneos (María Elsa Gómez de Ferraris & Antonio Campos Muñoz, 2009). Las HSC se encuentran rodeadas por células estromales en la médula ósea, anteriormente se creía que se localizaban en la borde interno del hueso, sin embargo, ahora se sabe que estas se encuentran en regiones perivasculares donde están presentes diferentes factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas y son las encargadas de la formación de células sanguíneas y hematopoyéticas, al igual que de los osteoclastos (células encargadas de la resorción ósea). Las MSC también intervendrán en la formación de células de linaje mesenquimatosos, entre las que se encuentran los osteoblastos, adipocitos, condrocitos y fibroblastos. Ambos tipos celulares están encargados de mantener una homeostasis ósea y generación de células (María Elsa Gómez de Ferraris & Antonio Campos Muñoz, 2009).

2.1.1.2. Osteoblastos

Miden alrededor de 20-30 μm , tienen forma poliédrica con un aparato de Golgi (AG) y Retículo endoplásmico rugoso (RER) grandes, su vida media es de 1-10 semanas y desaparecen por apoptosis o se convierten en osteocitos (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil et al., 2005). Su función principal es sintetizar la matriz ósea. Responden a diferentes señales (mecánicas, hormonales o de citocinas) para sintetizar matriz ósea. La matriz ósea incluye como fibras colágenas, así como diferentes proteínas no colágenas, posteriormente se depositan diferentes minerales produciendo una matriz mineralizada y los osteoblastos quedan embebidos en la matriz calcificada convirtiéndose en osteocitos (Tortora James & Derrickson Bryan, 2018).

2.1.1.3. Osteocitos

Son las células óseas maduras presentes en un mayor número dentro del tejido óseo, su forma es estrellada y su cuerpo se encuentra dentro de las lagunas denominados osteoplasmas, poseen prolongaciones citoplasmáticas que se comunican entre si a través de los conductos "calcódoros" llenos de fluido óseo extracelular, de tal suerte que crean una red de comunicación que les asegura un adecuado suministro de oxígeno y nutrientes (Tortora James & Derrickson Bryan, 2018). Esta interconexión

permite mantener y regular el tejido. Estas células no presentan división celular. Están involucrados en el remodelado óseo al detectar variaciones mecánicas en las fuerzas de carga (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil et al., 2005).

2.1.1.4. Osteoclastos

Son células grandes de alrededor de 100 μm , multinucleadas (5-50 núcleos) que poseen una gran cantidad de mitocondrias y vacuolas, derivan de la fusión de los monocitos, su origen es a partir de las células madre hematopoyéticas conocidas como “unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos” (CFU-GM). Se localizan en el endostio, la porción que está en contacto con el hueso tiene un plegamiento de membrana en forma rugosa característico denominado “borde de cepillo” (Fortoul, 2017; María Elsa Gómez de Ferraris & Antonio Campos Muñoz, 2009). Es a través de esta porción que la célula secreta diferentes sustancias como enzimas u ácidos que degradan los componentes orgánicos y minerales de la matriz ósea, en lo que se conoce como “resorción ósea” la cual permite un adecuado equilibrio entre la formación ósea y la degradación de este.

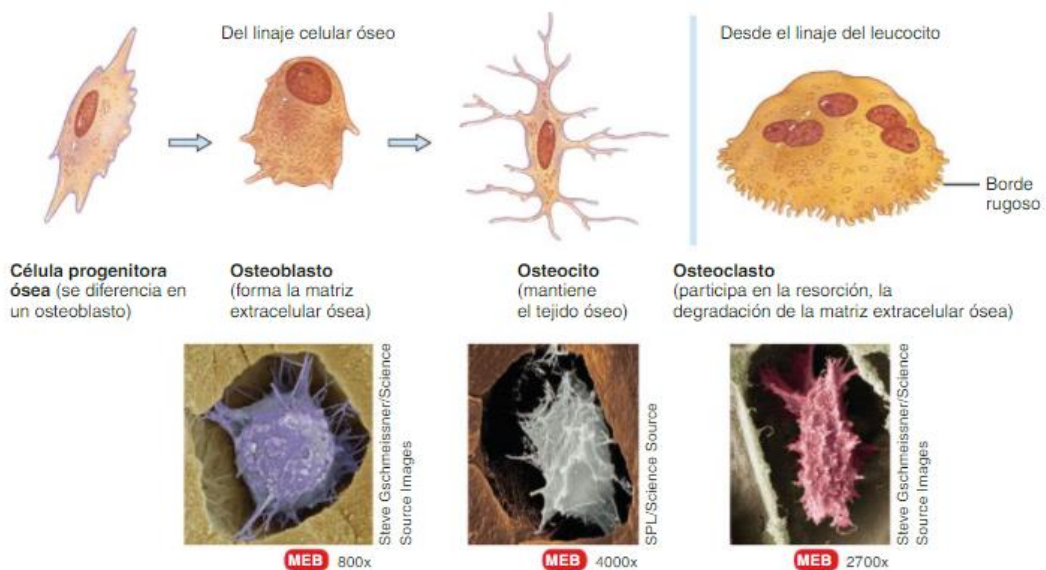


Imagen 1. Micrografías y esquemas de células residentes del tejido óseo. Tomada de Tortora James & Derrickson Bryan, 2018

2.1.1.5. Células bordeantes óseas.

Son células fusiformes y aplanadas, se localizan en lugares en los que no hay presencia de osteoblastos o de osteoclastos. Se unen entre sí y con osteocitos mediante uniones comunicantes. Su función es el establecer un límite o barrera en el tejido óseo que hace posible la formación de un microambiente, éstas se originan a partir de osteoblastos que finalizan su actividad funcional (María Elsa Gómez de Ferraris & Antonio Campos Muñoz, 2009). Todas estas células se encuentran rodeadas de una matriz ósea que en conjunto formarán una estructura tridimensional.

2.1.2. Matriz Ósea

Se divide en dos componentes: la matriz orgánica y la matriz inorgánica.

2.1.2.1. Matriz orgánica

También llama matriz osteoide, constituida principalmente de colágena tipo I en un 90 %, al presentar sus fibras dispuestas según las líneas de fuerzas tensionales confiere al hueso su resistencia mecánica. Además de la colágena tipo I, se encuentran la colágena tipo III y IV (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil et al., 2005).

El otro 10 % está constituido por proteínas no colágenas que corresponden a 8 % de glucoproteínas, fosfoproteínas y proteoglicanos, el otro 2 % es representado por enzimas como la fosfatasa alcalina, colagenasa y factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante (TGF) o el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), entre muchos otros. Las proteínas se suelen clasificar en tres grupos principales: glucoproteínas, proteínas que contienen ácido gamma carboxil-glutámico y proteoglicanos (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil et al., 2005).

Glucoproteínas

- Osteopontina: cuya función es actuar como agente de agregación celular.
- Osteonectina: de naturaleza ácida, tiene afinidad por la colágena, es específica del tejido óseo, de igual forma interactúa con la HA.
- Sialoproteína ósea: está asociada a la mineralización ósea, es rica en ácido aspártico, glutámico y glicina.

- Osteoprotegerina: secretada por osteoblastos, actúa inhibiendo la resorción ósea.
- Proteínas morfogénicas óseas (BMP's). Son una familia de proteínas que permiten la síntesis de DNA y proliferación celular (María Elsa Gómez de Ferraris & Antonio Campos Muñoz, 2009).

Proteínas con ácido gamma carboxil-glutámico

Osteocalcina o proteína Gla ósea (BGP). Secretada por osteoblastos, permite enlazar el calcio a la colágena. Para realizar sus funciones necesita cofactores como vitaminas K, B y C. (María Elsa Gómez de Ferraris & Antonio Campos Muñoz, 2009).

Proteína Gla de la matriz (MGP), presente en la matriz en fases previas a la maduración, su concentración se estimula por la presencia de vitaminas K, B y C. El inicio de la mineralización se asocia a la regulación de la homeostasis del calcio (María Elsa Gómez de Ferraris & Antonio Campos Muñoz, 2009).

Proteoglucanos

Dentro de estos se encuentran la decorina, cuya localización es próxima a los tendones y el biglicano, próximo a las células endoteliales y a sitios donde se lleva a cabo la síntesis y depósito de matriz ósea. La función principal de los proteoglucanos es el favorecer y controlar el depósito de sales de calcio. Estos también suelen unirse a glucosaminoglicanos (GAG) formando: condroitín sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato y el hialuronano o ácido hialurónico (María Elsa Gómez de Ferraris & Antonio Campos Muñoz, 2009).

2.1.2.2. Materia inorgánica o componente mineral

Desde 1771 Scheele informó la presencia de minerales de fosfato de calcio en los huesos. Estos componentes no tienen una composición uniforme (Breeland et al., 2021).

Dentro de estos minerales el más abundante es el fosfato de calcio (CaP) que se combina con otra sal mineral, el hidróxido de calcio $[Ca(OH)_2]$, que al reaccionar forman cristales de HA $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. A medida que se

forman los cristales también suelen combinarse con otro tipo de minerales como el carbonato de calcio (CaCO_3) y otros iones como el magnesio, fluoruro, potasio y sulfato (Tortora James & Derrickson Bryan, 2018). Los fosfatos de calcio se encuentran en la leche y sangre bovinas, son el principal componente del tejido óseo ~60 %, esmalte dental y otros tejidos duros del cuerpo humano (Eliaz & Metoki, 2017; Fernández-Tresguerres Hernández-Gil et al., 2005). El tamaño de un cristal de HA en el hueso es de ~40 nm de largo y ~2 nm de grosor (Fortoul, 2017).

2.1.3. Tipos de tejido óseo.

Juntos, células y matriz ósea se asocian para crear la estructura del tejido óseo, el cual no es un tejido sólido sin espacios, contiene numerosos espacios o porosidades que permiten que vasos sanguíneos discurran a través de ellos para la nutrición de las diferentes poblaciones celulares (Tortora James & Derrickson Bryan, 2018). El tejido óseo se puede clasificar en trabecular inmaduro (fibroso) y maduro (laminar) (Fortoul, 2017).

Hueso trabecular inmaduro

Formado por trabéculas que contienen osteocitos en sus lagunas embebidos en una matriz poco calcificada. Se encuentra en la osteogénesis y reparación de fracturas.

Hueso maduro

Formado por láminas óseas paralelas o concéntricas birrefringentes las lagunas contienen osteocitos cuyas prolongaciones ocupan canalículos que cruzan transversalmente las láminas hasta contactar con las prolongaciones de otros osteocitos.

A su vez, el tejido óseo maduro se clasifica en compacto (denso o cortical) y en hueso esponjoso (trabecular o medular).

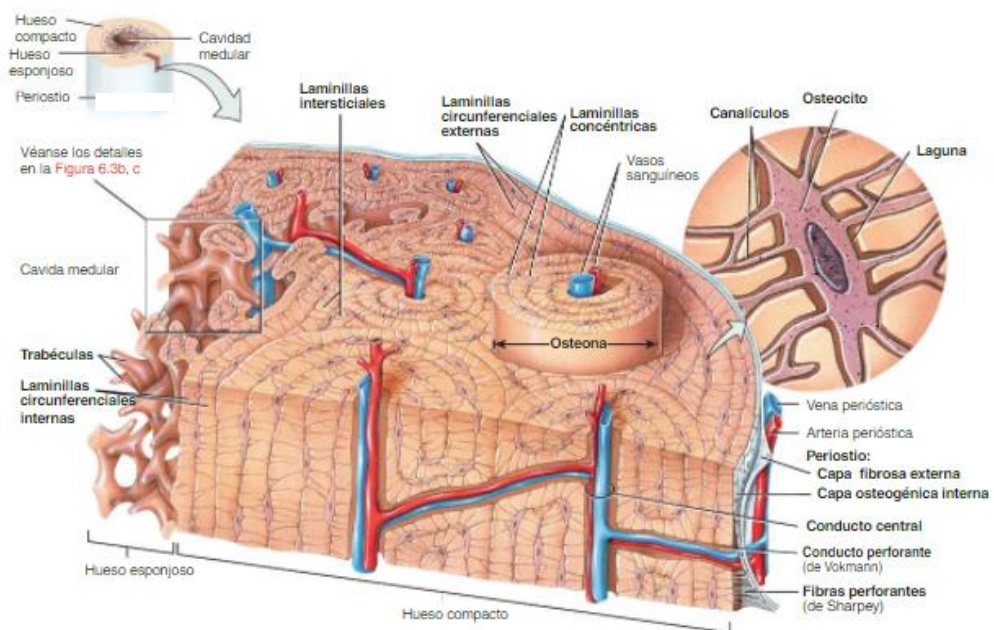
Tejido óseo compacto

Está formado por osteonas o sistemas de Havers las cuales son su unidad estructural (Fortoul, 2017). Cada osteona está formada por láminas concéntricas localizadas alrededor de un conducto central o conducto de Havers, el cual contiene vasos sanguíneos y prolongaciones nerviosas

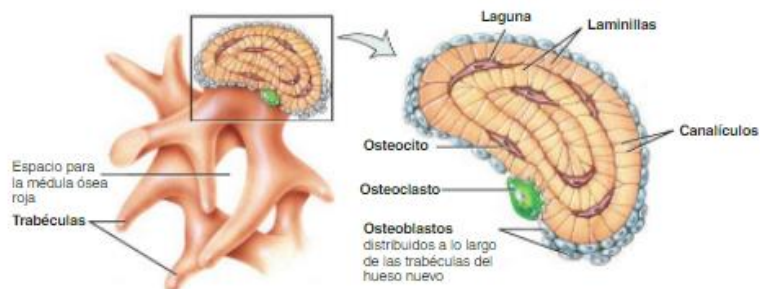
(Tortora James & Derrickson Bryan, 2018). Tiene una apariencia similar a la de los anillos de crecimiento de los árboles. Estas láminas concéntricas son placas circulares de matriz extracelular mineralizada de diámetro creciente, estos se disponen paralelamente uno de otro a lo largo de la longitud de un hueso. En estas láminas se encuentran las lagunas que contienen a los osteocitos, de las cuales irradian canalículos pequeños que contienen las prolongaciones de los osteocitos que se denominan procesos digitiformes y permiten la comunicación entre osteocitos, así como con el conducto central (Tortora James & Derrickson Bryan, 2018). Entre las osteonas se encuentran las laminillas intersticiales, en las cuales también hay presencia de osteocitos en sus lagunas.

Además, también existen conductos perforantes o de Volkmann que discurren transversalmente a los conductos de Havers. En la imagen 2 se puede observar la representación esquemática de este tipo de tejido óseo.

Imagen 2. Esquema de tejido óseo compacto. Tomada de Tortora James & Derrickson Bryan, 2018



(a) Osteonas (sistema de Havers) en el hueso compacto y trabéculas en el hueso esponjoso



(b) Sector ampliado de trabéculas del tejido esponjoso

(c) Detalles del corte de una trabécula

Tejido óseo esponjoso

También se denomina tejido óseo trabecular, a diferencia del tejido óseo compacto no contiene osteonas, se encuentra en el interior del hueso y está protegido por tejido óseo compacto. Formado por laminillas que se distribuyen de manera irregular en estructuras llamadas trabéculas o espículas (Fortoul, 2017). En este tipo de tejido óseo se pueden observar espacios macroscópicos, estos espacios contienen la médula ósea roja y médula ósea amarilla, así como una gran cantidad de vasos sanguíneos. Cada trabécula contiene laminillas concéntricas, osteocitos en sus lagunas y sus canalículos (Tortora James & Derrickson Bryan, 2018).

En huesos cortos, planos, sesamoideos o de forma irregular, este tejido se encuentra en su porción interna, mientras que en huesos largos encuentra en la epífisis y forma un borde angosto hasta la diáfisis (Tortora James & Derrickson Bryan, 2018).

A diferencia del tejido óseo compacto, el esponjoso es liviano, debido a la presencia de poros más grandes que los presentes en el hueso compacto, lo que reduce el peso total del hueso (Tortora James & Derrickson Bryan, 2018).

En la imagen 3 se puede observar un esquema de los dos tipos de tejido óseo maduro.

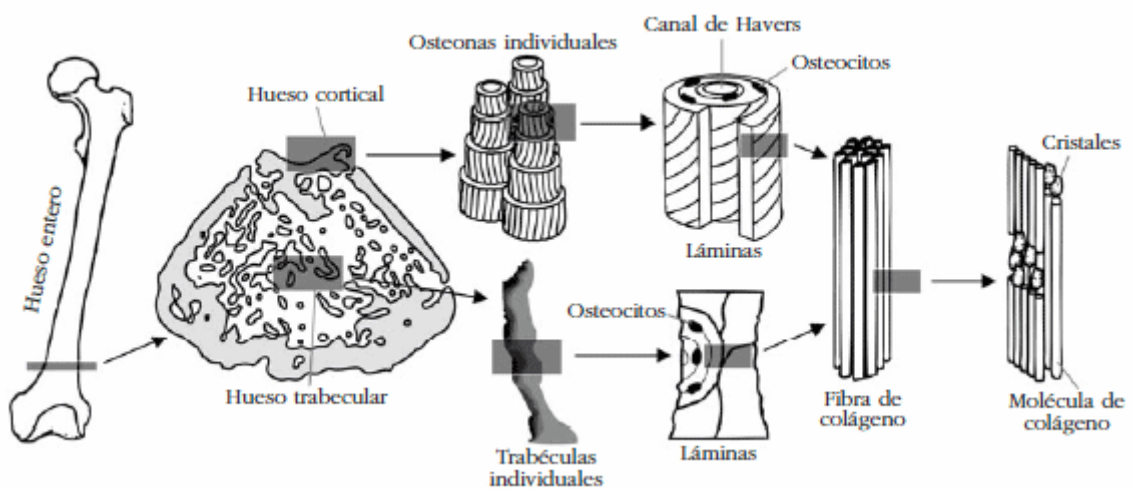


Imagen 3. Esquema de tejido óseo maduro: trabecular y compacto. Tomado de Caeiro et al., 2013

2.2. Biomateriales

En las últimas décadas los biomateriales han sido el foco de atención de muchas investigaciones en biomedicina, esto con el objetivo de aplicar los materiales al cuidado de la salud. Los materiales implantables son aquellos que están en contacto íntimo con los tejidos vivos, cuyo objetivo es el de lograr una adecuada interacción biológica entre el material y el huésped (Vallet-Regí et al., 2011).

La primera definición de biomaterial se dio en la primera Conferencia de Consenso de la Sociedad Europea de Biomateriales (ESB, por sus siglas en inglés):

“Un material no viable utilizado en un dispositivo médico, destinado a interactuar con sistemas biológicos”.

En la actualidad la ESB los define como:

“Material destinado a interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo”.

Otra definición de biomaterial es la siguiente:

“Un biomaterial es una sustancia que ha sido diseñada para tomar una forma que, sola o como parte de un sistema complejo, se utiliza para dirigir, mediante el control de interacciones con componentes de sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico, en humanos. o medicina veterinaria.” (Williams, 2009).

Como podemos observar, la definición de los biomateriales ha cambiado con el paso del tiempo, esto es porque las diferentes generaciones de biomateriales han tenido diferentes objetivos. En las décadas de 1960 y 1970 se buscaba que los biomateriales tuvieran propiedades mecánicas apropiadas, resistencia a la corrosión en un ambiente acuoso y no provocar toxicidad o carcinogenicidad en los tejidos vivos (Bhat & Kumar, 2013). Los biomateriales de segunda generación buscaban ser bioactivos, se desarrollaron vidrios bioactivos, cerámicas, polímeros, vitrocerámicos y materiales compuestos o composites (Bhat & Kumar, 2013; Boyan et al., 1998). Actualmente estamos en el desarrollo de la tercera generación de

biomateriales que tienen el objetivo de estimular una respuesta celular específica (Bhat & Kumar, 2013).

Entre las características que debe cumplir cualquier biomaterial destinado a usarse como terapéutico están (Ghassemi et al., 2018; María Elsa Gómez de Ferraris & Antonio Campos Muñoz, 2009):

- 1) Biocompatibilidad: es decir que permitan adhesión y proliferación celular, así como ausencia de toxicidad y reacciones inflamatorias.
- 2) Estructura adecuada en términos de forma, porosidad y tamaños de poro para penetración celular, transferencia de nutrientes y desechos, y angiogénesis.
- 3) Capacidad de entrega controlada de moléculas o fármacos bioactivos.
- 4) Biodegradabilidad para la sustitución segura programada del material del andamio/injerto óseo con deposición de osteoide.
- 5) Propiedades mecánicas para soportar peso durante el período de mejora.
- 6) Esterilidad sin pérdida de bioactividad.

Cabe mencionar que los biomateriales son uno de los tres pilares de la ingeniería de tejidos que, junto con moléculas bioactivas y células, tienen el objetivo de reemplazar tejidos dañados.

Existen cuatro familias principales de biomateriales, estas se clasifican de acuerdo con su composición química como:

2.2.1. Metálicos

Se emplean como biomateriales debido a sus propiedades de conductividad eléctrica y térmica, como por sus propiedades mecánicas (Bhat & Kumar, 2013). Poseen enlaces metálicos que tienen una nube de electrones que rodean los átomos, lo cual permite una transferencia eléctrica y térmica. Se genera un arreglo atómico de alta gravedad específica, que origina amplios rangos de puntos de fusión, los cuales pueden ir de 250 °C para el estaño, hasta 3396°C para el tungsteno (Roldán Vasco et al., 2016). Su empleo es principalmente para reemplazo de tejidos duros, como sustitución de cadera, articulaciones de rodilla, dispositivos de fijación espinal e implantes

dentales, también se emplean aleaciones metálicas como cables guías de catéteres, arcos de ortodoncia e implantes de cóclea (Roldán Vasco et al., 2016).

Estos materiales tienen como desventaja que no pueden funcionar como andamios para interacción con células en la ingeniería de tejidos y que no pueden ser degradados en los ambientes biológicos (Roldán Vasco et al., 2016).

2.2.2. Cerámicos

Son materiales no metálicos inorgánicos que se originan a partir de alúmina, zirconio, carbono, fosfatos de calcio y compuestos de sílice, entre otros (Salinas & Vallet-Regí, 2008). Se unen mediante enlaces iónicos y covalentes, comparados con metales y polímeros son duros y frágiles, no combustibles y no oxidables. Se emplean en ambientes de alta temperatura, corrosivos y tribológicos (ambientes con alta fricción). Tienen alta resistencia a la compresión, pero baja resistencia a la tensión. En general sus temperaturas de fusión rondan los 2200°C, en promedio y tienen baja conductividad eléctrica y térmica (Roldán Vasco et al., 2016). Se emplean como implantes, ya que no son tóxicos, ni cancerígenos, no producen alergias, inflamación, son biocompatibles y biofuncionales. Pueden ser reabsorbibles, lo cual los hace útiles como dispositivos liberadores de fármacos, reparación y rellenos óseos (reparación en vertebras de columna, defectos dentales y maxilofaciales), debido a que algunos de ellos contienen minerales sustituyentes del hueso como la HA (profundizado más adelante). Otra ventaja de estos es que su porosidad puede ser controlada, lo cual permite que se favorezca el crecimiento e integración a los tejidos del cuerpo (Roldán Vasco et al., 2016).

2.2.3. Polímeros

Se producen debido a la unión de miles de moléculas pequeñas denominadas monómeros, que forman cadenas grandes o macromoléculas de diferentes formas. La mayoría de los polímeros están formados por estructuras de carbono, por lo que son compuestos orgánicos. Pueden ser de origen natural o sintético, su principal ventaja es su facilidad de fabricación y de producir diferentes formas y tamaños (películas, láminas,

fibras, etc.). Se suelen utilizar para producir suministros médicos desechables, materiales protésicos, implantes, encapsulantes, sistemas liberadores de fármacos, entre otras (Roldán Vasco et al., 2016).

Son biocompatibles, no son citotóxicos, ni cancerígenos, son esterilizables, tienen adecuada elasticidad, durabilidad y resistencia, que pueden ser adaptables a los requerimientos de las aplicaciones. Se pueden modificar superficialmente para mejorar su biocompatibilidad e interacción celular (Roldán Vasco et al., 2016).

2.2.4. Compuestos (mezcla de dos o más)

Contienen dos o más materiales o fases constituyentes diferentes en una escala mayor que la atómica. Su propósito es combinar las propiedades de los materiales constituyentes para mejorarlas. Es importante que los constituyentes sean biocompatibles y su interfaz no debe ser degradada por el cuerpo. Se emplean como materiales de relleno dental, cementos óseos de metilmetacrilato e implantes ortopédicos con superficies porosas (Roldán Vasco et al., 2016).

Los materiales denominados bionanocompuestos pueden ser prometedores para usos en matrices de polímeros reforzadas con nanomateriales, por ejemplo, los compuestos formados por ácido poliláctico (PLA) y nano HA. Permiten emular la naturaleza del hueso al combinar la tenacidad de la fase polimérica y la alta resistencia a la compresión de la HA, con lo cual se genera un material bioactivo con propiedades mecánicas mejoradas y amplio rango de degradación. Otros compuestos combinan HA con PLA y gelatina, con lo que se combina la osteoconductividad de la HA (Roldán Vasco et al., 2016).

Otra forma de clasificar los materiales es de acuerdo con su origen (Bhat & Kumar, 2013):

- **Sintéticos:** obtenidos de manera artificial, en los cuales están los metales, polímeros sintéticos, cerámicos y compuestos o composites.
- **Naturales:** derivados de fuentes naturales, ya sea de origen animal o vegetal, entre los que se encuentran polímeros naturales como la colágena, o cerámicos como HA.

- **Semisintéticos o híbridos:** Estos son la combinación de los dos anteriores.

2.3. Hidroxiapatita

Es un material cerámico, forma parte de las apatitas cuya fórmula general es $M_{10}(XO_4)_6Z_2$, donde M es un metal con los aniones XO_4^{3-} y Z. El nombre de cada apatita dependerá de los radicales M, X y Z, en la HA M es el Ca^{2+} , X es el fósforo P^{5+} y Z es el radical hidroxilo OH^- , con esto la fórmula queda de la siguiente forma $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

Como se revisó anteriormente, el tejido óseo contiene cerca de ~69 % de materia inorgánica, representada principalmente por HA, ~9 % de agua y ~22 % de matriz orgánica; algo importante a destacar es que la proporción Ca/P del hueso humano es de 1.67 (Guillen-Romero et al., 2019). Además del tejido óseo, la dentina, el esmalte y el cemento también contienen elevados porcentajes de minerales inorgánicos (Sáenz et al., 1999) los cuales se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Composición mineral de tejidos mineralizados y HA sintética. Modificada de Saenz, 1999

Mineral	Esmalte dental	Dentina	Hueso	Hidroxiapatita sintética
Calcio	36.1	35.0	35.5	39.0
Fósforo	17.3	17.1	17.1	18.5
Dióxido de carbono	3.0	4.0	4.4	-
Magnesio	0.5	1.2	0.9	-
Sodio	0.2	0.2	1.1	-
Potasio	0.1	0.07	0.1	-
Clorina	0.3	0.03	0.1	-
Flúor	0.016	0.017	0.02	-
Azufre	0.01	0.2	0.6	-
Zinc	0.016	0.018	-	-
Sílice	0.003	-	0.04	-
Radio atómico Ca/P	1.62	1.59	1.667	1.667
Cristalinidad	70-75	33-37	33-37	80-100

La similitud estructural y funcional de la HA sintética con los tejidos mineralizados, la hace una mejor opción como sustituto óseo sobre los fosfatos tricálcicos y cerámicas de biovidrio (Szcześ et al., 2017). Es un

material bioactivo y biocompatible, otra ventaja es que se puede obtener por diversos procesos de fabricación. Entre las técnicas de obtención de HA se encuentran la precipitación, hidrolisis y síntesis hidrotermal; también se obtiene de diferentes fuentes como esqueleto de peces, conchas marinas, cáscara de huevo, huesos de bovino, exoesqueleto de camarón, entre muchas otras (Szczesz et al., 2017).

Como mencionamos, debido a su biocompatibilidad, osteoconductividad, propiedades mecánicas, la HA es usada como injerto aloplástico. Su comportamiento mecánico, así como la velocidad de osteointegración dependen del tamaño de sus cristales, porosidad y la interconectividad entre ellos (Guillen-Romero et al., 2019).

2.4. Proceso Gel-casting modificado

Para controlar la porosidad de andamios de HA se ha desarrollado un proceso denominado Gel-Casting modificado (PGCM), desarrollado por Rivera-Muñoz en el año 2011. Este PGCM posee varias ventajas como: obtención de una estructura uniforme y de alta resistencia, simplicidad, formación rápida del gel, los moldes pueden fabricarse de cualquier material, se producen piezas de tamaño, forma y porosidad controlada, así como su bajo costo debido a que casi todos sus pasos se llevan a temperatura ambiente (E. Rivera-Muñoz et al., 2003). Estas ventajas hacen de dicho método de moldeado de HA una gran alternativa para la confección de implantes (con forma y composición química similar al hueso) dirigidos a la regeneración ósea.

Este proceso consta de dos fases: una orgánica y otra inorgánica, primeramente, se realiza la preparación de la fase inorgánica, la cual se da al mezclar polvos de HA con etanol (solvente), polivinil butiral (aglutinante), polietilen glicol (plastificante), ácido poliacrílico (dispersante) ácido oxálico (agente formador de microporos) y microesferas de polimetil metacrilato (agente formador de macroporos). Una vez mezclados, se colocan en moldes prefabricados con la forma que se desea obtener (a temperatura ambiente), para después ser desmoldados. Posteriormente se calcinan los polímeros mediante el proceso de sinterizado, son colocados en una mufla especial para ser llevados a un horno el cual incrementará su temperatura

a razón de 1°C por minuto hasta alcanzar una temperatura de 1100°C, se mantiene por dos horas para eliminar todos los agentes, excepto la HA (Alonso-Sierra Susana, 2013; E. M. Rivera-Muñoz et al., 2001).

Al obtener la muestra cerámica se adiciona la fase orgánica la cual puede ser colágena o gretina, añadiéndola por goteo a la muestra para obtener el material compuesto (Alonso-Sierra Susana, 2013).

Adicional a esto se ha planteado la posibilidad de añadir péptidos que potencien la capacidad osteoinductora del material, esto debido a que muchos pasos se llevan a temperatura ambiente, permitiendo añadir moléculas como péptidos y proteínas sin modificar su estructura.

2.5. Péptidos usados en regeneración ósea

Los péptidos son cadenas cortas de aminoácidos que contienen secuencias con una función específica, conocidos como motivos proteicos (Bullock et al., 2021). Sus tamaños pueden variar de menos de 20 hasta por debajo de 100 aminoácidos (Bermúdez et al., 2021). En el caso de la regeneración ósea, estos péptidos suelen provenir de proteínas relacionadas a la formación de tejido óseo (Bullock et al., 2021). Estos péptidos se usan frecuentemente, debido a que presentan menos problemas en comparación con la utilización de las proteínas completas; entre los que están la dificultad de síntesis de algunas proteínas, problemas asociados a la respuesta inmune local y la susceptibilidad de degradación (Bermúdez et al., 2021). Un ejemplo de esto es que las proteínas tienen un plegamiento específico, el cual al unirse a un material o interactuar con el medio puede verse modificado lo que ocasiona que los dominios de señalización estén ocultos, es decir que no estén disponibles para interactuar adecuadamente con el medio (Ma, 2008). Los péptidos, al no tener el mismo plegamiento de las proteínas completas, pueden dejar “al descubierto” algunas regiones con actividad biológica. En cuanto a la inmunogenicidad, las proteínas son sintetizadas por métodos recombinantes, que requieren procesos de purificación, así como numerosos controles de calidad que suelen representar un alto costo. Los métodos de síntesis de péptidos, como el método en fase sólida son relativamente menos costosos que sintetizar la proteína completa (dependerá del tamaño del péptido y los residuos que lo

conformen), así como más eficientes para lograr una mayor síntesis y pureza de los péptidos (Bullock et al., 2021).

Existen numerosos péptidos que han sido estudiados para la regeneración ósea, a continuación, mencionaremos algunos de estos.

2.5.1. Péptidos RGD

Descubiertos por Pierschbacher en 1984, contienen arginina, glicina y ácido aspártico. Este dominio se encuentra en proteínas de la matriz ósea como la fibronectina, vitronectina y colágena. La unión a este tipo de péptidos se da por las integrinas, que permiten su reconocimiento e interacción, el hecho de que las integrinas están en muchos tipos celulares puede conducir a respuestas inespecíficas. Aunque aumentan la adhesión y propagación celular no siempre es así. Este tipo de péptidos se han utilizado para mejorar la osteoinducción de andamios de HA uniéndolos mediante adsorción con resultados variables en estudios *in vivo* donde se han reportado diferenciación osteogénica, así como aumento de la mineralización de la matriz, por otro lado, también se ha informado que no causa efectos negativos en la adhesión de osteoblastos (Bullock et al., 2021).

2.5.2. Péptidos FHRIKA y KRSR

La unión de osteoblastos no sólo se da por integrinas, sino también por la integración de proteoglicanos de heparán sulfato transmembrana, los cuales tienen secuencias de unión a heparina que se encuentran en proteínas asociadas al tejido óseo (Bullock et al., 2021).

FHRIKA, fue descubierto en 1999, contiene un dominio de unión a heparina que permite la proliferación y propagación celular, así como mineralización de la matriz celular. Se ha usado para funcionalizar superficies de cuarzo mediante silanización (Bullock et al., 2021).

KRSR es un péptido de unión a heparina presente en la sialoproteína ósea, osteopontina y trombospondina, se informó sobre ella en 1998, dentro de sus funciones se encuentra la adhesión de células osteogénicas sobre vidrio de borosilicato (Bullock et al., 2021) .

2.5.3. Péptido P15

Es un péptido contenido en la secuencia de la colágena tipo I (Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Arg-Gly-Val-Val), se reportó en 1997. En estudio *in vitro e in vivo*, mejora la unión y proliferación de células osteogénicas, así como la diferenciación de células troncales. Puede actuar como un sustituto de colágena, esta secuencia ha sido aprobada por la FDA para tratar defectos periodontales y se vende bajo la marca PepGen p-15® de la casa comercial Dentsply. Se ha realizado su unión a hueso bovino mediante adsorción superficial, disminuye la adhesión de fibroblastos y aumenta la adhesión de células osteogénicas. Al usarse en humanos se ha encontrado que permite la regeneración del ligamento periodontal (Bullock et al., 2021).

2.5.4. Péptidos biomiméticos de BMP

Las proteínas morfogénicas óseas han sido estudiadas en el campo de la regeneración ósea. Se ha utilizado un péptido derivado de la BMP-2 conocido como P24 (Ser-Lys-Ile-Pro-Lys-Ala-Ser-Ser-Val-Pro-Thr-Gly-Leu-Ser-Ala-Ile-Ser-Thr-Leu-Tyr-Leu-Asp-Asp-Asp, así como otros derivados de BMP-7 y BMP-9 estos contienen epítomos del nudillo de la proteína que permite su unión a receptores de BMP como mecanismo de acción. Tanto BMP-2 como su péptido tienen un tiempo de retención bajo, lo cual reduce su eficacia, siendo la metodología de unión para prolongar su liberación su principal limitante (Bullock et al., 2021).

2.5.5. Péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento (pHACD1/CAP)

Este péptido proviene de la proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP) que es la isoforma 2 de la proteína 3-hidroxiacil-CoA dehidratasa 1 (HACD1)(Valdés De Hoyos et al., 2012) esta última está formada por 288 aminoácidos y su función es catalizar la reacción de elongación de ácidos grasos de cadena larga en el músculo cardíaco (Blondelle et al., 2015; Uwanogho et al., 1999). Su gen codificante posee 6 exones y se localiza en el cromosoma 10 p13-14 (Álvarez-Pérez et al., 2006; Saito et al., 2001; Liu et al., 1997; Barkana et al., 2000). HACD1/CAP es un splicing alternativo del gen HACD1 y está formada por 140 residuos, siendo

los primeros 125 residuos los mismos que se presentan en la región amino-terminal de HACD1. Sin embargo, los últimos 15 residuos del carboxilo terminal son únicos de HACD1/CAP (Álvarez-Pérez et al., 2006).

HACD1/CAP fue la primera proteína cemento específica identificada, caracterizada y purificada a partir de extractos de cemento maduro de bovino y de humano (Arzate et al., 1992). Esta proteína ha demostrado estar involucrada en el reclutamiento y diferenciación de cementoblastos, por lo que participa activamente en la formación del cemento radicular y en el proceso de mineralización. Mientras que su función a nivel celular parece estar regulada por las vías de señalización intracelular Smad-1 y la vía de MAPK (Montoya et al., 2014).

El análisis *in silico* muestra que HACD1/CAP tiene un peso molecular de 14.9 kDa y un punto isoeléctrico es de 7.78, mientras que, en ensayos experimentales, se ha demostrado que tiene la capacidad de formar cristales de HA en un sistema libre de células (Montoya, 2015).

Derivado de la caracterización bioquímica y estructural de la proteína HACD1/CAP y del hecho de que justo el sitio activo de la proteína HACD1 es el lugar del corte en el splicing alternativo del gen y su sustitución por la secuencia única de 15 aminoácidos (VSFPSCCFSAIVIFM); se hipotetizó que dicha secuencia confiere a HACD1/CAP una función distinta a la de HACD1, y que esta región es la que dirige el proceso de mineralización en la proteína (Nidome, 2018).

En el Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología se han realizado trabajos experimentales empleando el péptido que contiene únicamente la secuencia de C-terminal de HACD1/CAP VSFPSCCFSAIVIFM (pHACD1/CAP). Tiene un peso molecular de 1.65 kDa y un punto isoeléctrico de 5.48 (Salgado, 2014). Se estudió su actividad al inducir la formación de cristales de HA en un sistema libre de células, mimetizando así la función de la proteína hrHACD1/CAP. En este caso, se colocaron diferentes concentraciones de péptido 2.5, 7.5, 10, 15 y 20 µg/mL, es decir 0.00025%, 0.0005%, 0.00075 %, 0.001%, 0.0015% y 0.002% en placas de 96 pozos con 10 µL de solución de fosfato (KH₂PO₄ 10 mM,

Na₂HPO₄ 20mM y NaCl 150mM pH 7.4), 80 µL de solución buffer (HEPES 50mM, NaCl 150mM, a pH 4) y 10 µL de solución de Calcio (CaCl₂ 50mM, HEPES 50mM, NaCl 150mM a pH 4), se caracterizaron los cristales obtenidos que correspondían a la fase mineral de HA, los cuales fueron altamente ordenados, además se encontró que a una concentración de 0.00075% el péptido parecía actuar como inhibidor de la nucleación mientras que a 0.002% es la cantidad óptima para actuar como nucleador de los cristales de HA (Montoya, 2015). En 2014 se estudió la regeneración de defectos óseos severos en tibias de conejo con el uso del pHACD1/CAP (Salgado, 2014). El trabajo consistió en realizar un defecto segmental de 10 mm en la tibia de conejos Nueva Zelanda e implantar el péptido contenido en un vehículo de gelatina reabsorbible. Los resultados demostraron que en el grupo donde se implantó el péptido se obtuvo hasta un 70% de regeneración de tejido óseo en la zona del defecto (Salgado, 2014).

En 2016 se utilizó pHACD1/CAP en un estudio preclínico como tratamiento de la osteoporosis en un modelo inducido en ratas Wistar (Hernández, 2016). Se utilizó una dosis diaria durante 12 semanas del péptido de 40 y 80 µg/día en los grupos experimentales. Después de la eutanasia de los animales, se realizaron pruebas biomecánicas de compresión a la 5ta vértebra lumbar, el análisis histológico del tejido óseo de vertebras y la cabeza del fémur, así como el análisis de la densidad mineral ósea (Hernández, 2016). Los resultados demostraron que los animales a los que se les administró pHACD1/CAP aumentaron su densidad mineral ósea a 91 y 92 % (40 y 80 µg, respectivamente) comparados con el grupo control sin tratamiento cuya densidad ósea era de 76 % (Hernández, 2016). La resistencia a la compresión también se incrementó en los grupos tratados con el péptido, mientras que el análisis histológico demostró un aumento en el grosor trabecular óseo y con características muy similares al tejido óseo sano (Hernández, 2016).

En el año 2020 se realizó un estudio de funcionalización de superficies de titanio (Ti) y óxido de titanio (TiO₂) con pHACD1/CAP incubadas en una solución de saliva artificial a pH fisiológico. Se observó la adsorción del

péptido sobre las superficies mediante microscopia de fuerza atómica en donde las superficies tratadas con el péptido mostraban menor rugosidad que los grupos control, lo cual se atribuyó a que el péptido se alojaba en estas rugosidades (Ureiro, 2020). Además, realizaron pruebas de viabilidad celular en donde las superficies funcionalizados permitieron una mayor sobrevivencia celular que los grupos control (Ureiro, 2020). También, encontraron la formación de depósitos de minerales a los 21 días de incubación que al ser caracterizados mediante EDS, XRD y espectroscopía infrarroja transformada de Fourier por reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), correspondían a HA carbonatada, demostrando una vez más la capacidad del péptido para organizar y dirigir la formación de cristales de HA (Ureiro, 2020).

Finalmente, el estudio más reciente donde se utilizó el pHACD1/CAP se reportó en 2022, donde se demostró su eficacia para el tratamiento de defectos periodontales en modelos de rata wistar, donde se realizó un defecto de tamaño crítico de 3 x 2 x 1 mm en la raíz vestibular del primer molar inferior derecho (Aguilar, 2022). Para el grupo experimental utilizaron satín más el andamio de Gelfoam® embebido con en una solución de 25µg/mL de pHACD1/CAP, hubo dos grupos control, a uno se les colocó satín y gelfoam y al otro sólo satín realizando la eutanasia de los animales a los 30 días (Aguilar, 2022). Se estableció que el grupo experimental tratado con pHACD1/CAP induce la regeneración de los tejidos periodontales: cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar (Aguilar, 2022).

Estas investigaciones establecen un precedente del potencial biotecnológico del péptido pHACD1/CAP en el área de la regeneración ósea. Por primera vez se cuenta con un péptido que mimetiza la función biológica en el proceso de mineralización de la proteína HACD1/CAP, lo que permite poder obtener grandes cantidades del péptido a un costo menor comparado con el de producir la proteína completa de manera recombinante y hacerlo así una opción terapéutica viable.

2.6. Metodologías de unión de péptidos a biomateriales

Existen diferentes métodos para unir péptidos a biomateriales que van desde la adsorción hasta procesos químicos de múltiples pasos. Estos métodos tienen como objetivo permitir la funcionalización del biomaterial al añadir moléculas osteoinductoras como los péptidos previamente mencionados.

2.6.1. Adsorción

Es la más utilizada debido a que es simple, en esta los sustratos como HA se incuban en una solución que contiene una concentración del péptido elegido, permitiendo una interacción física representada por interacciones débiles como fuerzas de Van der Waals (Bullock et al., 2021).

En ocasiones los péptidos son modificados al agregar secuencias de aminoácidos que tienen afinidad hacia el material elegido, sin embargo, esto representa una alteración de la secuencia que podría afectar la estructura original del péptido, comprometiendo su función.

Algunas complicaciones observadas son el control de la concentración o la liberación del péptido. Se han realizado estudios donde se observa la liberación del 50% del péptido en 14 días, otros autores han mencionado que se pierde un 100% en los primeros 4 días (Bullock et al., 2021).

2.6.2. Silanización

Suele usarse para unir materiales con grupos hidroxilo como en la HA, primero se usa un agente oxidante para dejar los hidroxilos necesarios, que reaccionan con el siloxano, que es altamente reactivo y se une covalentemente al hidroxilo, para posteriormente unirlo a los extremos carboxilo de los péptidos, sin embargo, en estas reacciones suelen requerirse temperaturas de 120 °C, lo cual podría afectar a los componentes orgánicos. Como ventajas, están que la capa de silano generada tiene propiedades osteoconductoras y que no es tóxica (Bullock et al., 2021).

2.6.3. Reticulación por carbodiimida

La carbodiimida permitirá la reticulación mediante la formación de un enlace amida, en este caso no se requiere usar átomos adicionales como en la silanización, puede ser realizada a temperatura y presión ambientales, de

igual forma se obtienen subproductos que son inofensivos que se eliminan en los pasos de lavado posteriores. Las reticulaciones obtenidas son resistentes a la digestión enzimática y pueden unir covalentemente la colágena a sustratos. Se usan 3 cabodiimidias: diclohecilcabodiimida, N-diisopropilcarbodiimida y 3-dimetilaminopropil-3-etilcarbodiimida, la es la más usada, ya que las otras dos son alérgicas e insolubles en agua (Bullock et al., 2021).

3. Planteamiento del problema

El tratamiento de los pacientes con defectos óseos se ve comprometido por la falta de capacidad osteoinductiva y osteoconductora de los materiales empleados para dicho fin, lo cual provoca que muchos de los tratamientos sean prolongados e incluso deficientes. Actualmente no se cuenta con un material sintético que sea osteoinductivo, osteoconductor y que pueda ser modelado a las necesidades del paciente.

Por lo anterior, hacemos la siguiente pregunta de investigación: ¿la adición de pHACD1/CAP a los andamios de HA sintetizados por el PGCM promoverá interacción química entre el péptido y el andamio?

4. Justificación

Existe la necesidad de buscar nuevas alternativas que integran materiales osteoconductores y moléculas osteoinductoras para mejorar la regeneración ósea. Por lo tanto, es importante el diseño y estudio de biomateriales que mimeticen la estructura del tejido óseo, tanto a nivel estructural, de composición química y con moléculas que se sabe que promueven el proceso de mineralización. La combinación de una hidroxiapatita sintética con características químicas y de estructura similares a las que se encuentran en el tejido óseo, con una molécula que ha demostrado promover el proceso de mineralización (pHACD1/CAP) puede generar un tratamiento prometedor en la regeneración de tejido óseo.

5. Hipótesis

pHACD1/CAP tendrá una interacción química con la hidroxiapatita sintetizada por el proceso de gel-casting modificado.

6. Objetivos

6.1. General

Analizar la interacción química y su efecto en la estructura y composición de la HA obtenida por gel casting funcionalizada con pHACD1/CAP.

6.2. Objetivos específicos

1. Generar muestras de HA por PGCM de 9 mm de diámetro por 15 mm de grosor con la adición de péptido y sin péptido.
2. Caracterizar el material mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía por dispersión de energía de Rayos X (EDS), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía Raman y difracción de rayos X (XRD),
3. Realizar una propuesta teórica por docking molecular, de la interacción entre la HA con el pHACD1/CAP

7. Metodología

7.1. Síntesis de pHACD1/CAP

La síntesis del péptido se realizó por la técnica de en fase sólida Fmoc/tBu, que permitió la obtención de la secuencia de 15 aminoácidos del C-terminal de la proteína HACD1/CAP (VSFPSCCFSAIVIFM) (Invitrogen, Carlsbad, USA).

7.2. Diseño y fabricación de los moldes para elaborar hidroxiapatita

Se diseñó y elaboró un contenedor cilíndrico de aluminio de 12 cm de diámetro interno, de 1 cm de grosor y 2 cm de profundidad (imagen 4a). En el interior del contenedor se fijaron diferentes moldes de acero inoxidable: cilindros de 0.9 cm y de 0.5 cm de diámetro, ambos por 1.5 cm de largo y prismas rectangulares de 0.9 cm y de 0.5 cm por lado por 1.5 cm de altura (imagen 4b).

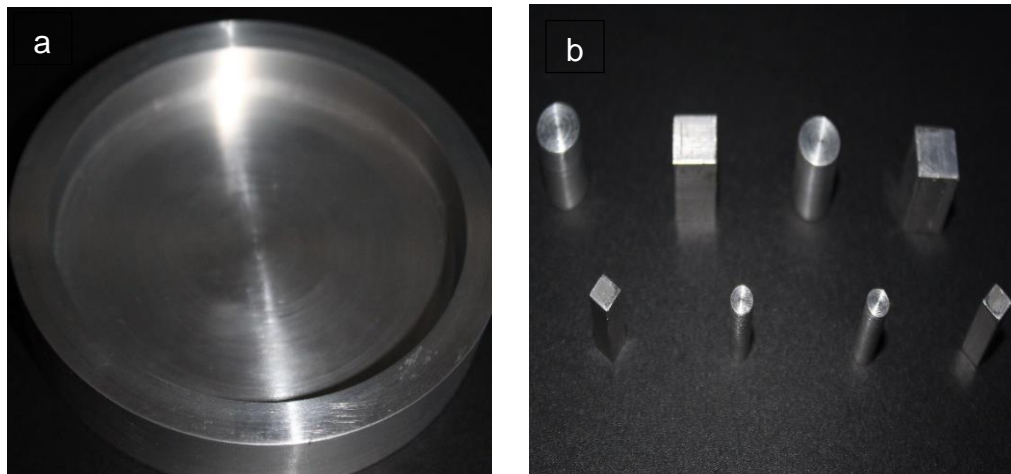


Imagen 4. a) Contenedor Cilíndrico. b) Diferentes tipos de piezas para obtención de hidroxiapatita de diversas formas

Una vez obtenidos tanto el contenedor cilíndrico como las piezas de diferentes formas, estas últimas se pegaron en el contenedor usando cianoacrilato, para posteriormente obtener moldes en negativo de silicón (imagen 5).

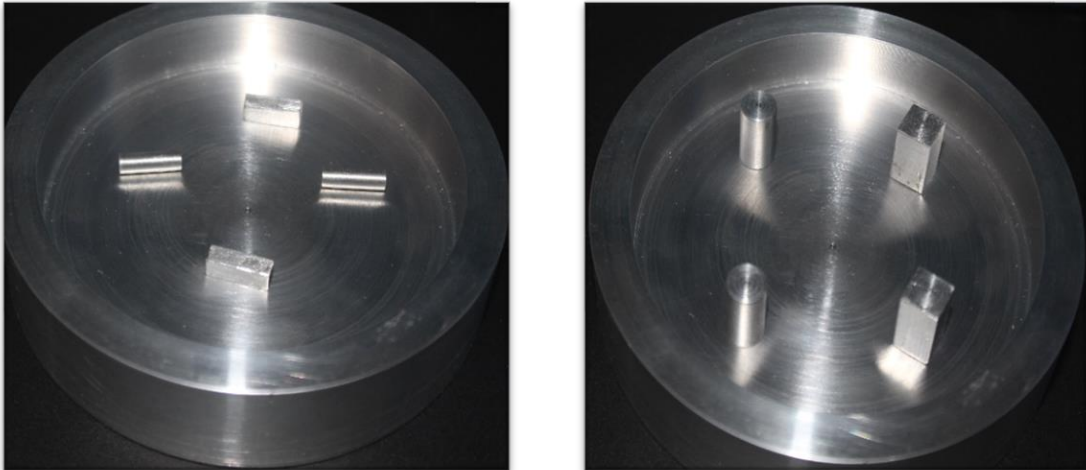


Imagen 5. Disposición para la obtención de moldes negativos.

Se utilizó silicón p-53 (imagen 6) para la realizar el “molde negativo” (imagen 7) y se confeccionaron estos moldes, para comenzar a realizar el método de síntesis.



Imagen 6. Silicón P-53

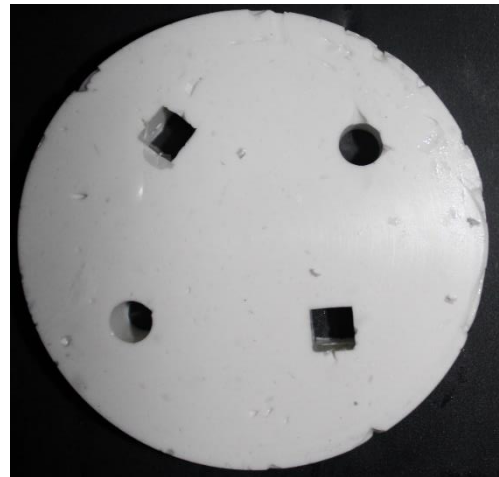


Imagen 7. Molde en negativo hecho con silicón P-53

7.3. Elaboración de la fase inorgánica del proceso de Gel casting modificado (PGCM)

En trabajos previos ha reportado el uso del PMMA (polimetilmetacrilato) para obtener porosidades de hasta 50 μm y de ácido oxálico para obtener poros de menos de 5 μm . En este trabajo se utilizaron esferas de varios polímeros para conseguir porosidades, además del ácido oxálico. Los polímeros empleados fueron:

Polimetilmetacrilato (PMMA): su fórmula química es $[\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CO}_2\text{CH}_3)]_n$, es insoluble en agua. Tiene una temperatura de ignición (temperatura a la que una molécula se incinera por completo) de 300 °C. Estas tienen diferentes tamaños y tienen una forma esferoidal que nos permite obtener diferentes porosidades, si bien el fabricante no indica el tamaño de las partículas, se le han realizado análisis por técnicas de microscopía para determinarlo, de ellas se estableció que las partículas tienen un tamaño ~20 - 40 μm . El PMMA fue obtenido de la casa comercial Sigma Aldrich®.

Polietilmetacrilato (PEMA): tiene la siguiente fórmula química $[\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5)]_n$, su temperatura de ignición es ~100 °C. Este posee diferentes tamaños ~200 μm . Este compuesto tampoco reaccionará químicamente con alguno de los otros reactivos usados en el PGCM, también se obtuvo de la casa comercial Sigma Aldrich®.

Polibutilmetacrilato (PBMA): $(\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2)_n$ este compuesto tiene la particularidad de ser disuelto en diversos solventes, en los cuales debe estar en agitación por un periodo de 12 h, por lo que al mezclar con los otros reactivos no se degradará, su temperatura de transición es de 107 °C por lo que a temperaturas mayores llegará a su punto de ignición. Al observar sus partículas estas presentan un tamaño de ~50 μm . Obtenido de la casa comercial Sigma Aldrich®.

Para llevar a cabo el PGCM se utilizaron los reactivos presentes en la tabla 2.

Tabla 2. Reactivos usados en el Proceso Gel Casting Modificado

Reactivos	Cantidad	Función en el PGCM
Etanol (EtOH) (Merk)	15 ml	Solvente
Polivinil butiral (PVB) pm 36,000 (Fluka)	0.625 g	Aglutinante
Polietilen glicol (PEG) pm 6,000 (Fluka)	0.57 g	Plastificante
Ácido poliacrílico (APA)	0.1 g diluidos en 1 ml	Dispersante
Hidroxiapatita (HA) (Aldrich)	7.5 g	Polvos de cerámica
Ácido oxálico (Ac Ox) (Fluka)	0.3 g	Formador de microporos
Microesferas de polimetilmetacrilato, Polibutilmetacrilato, Polietilmetacrilato (SigmaAldrich®)	En muestras de PEMA y PBMA se usaron 1.5 mg de cada uno, para el PMMA, debido a que su densidad es poca se usó como medida 10mL de una probeta de 50mL	Formador de macroporos

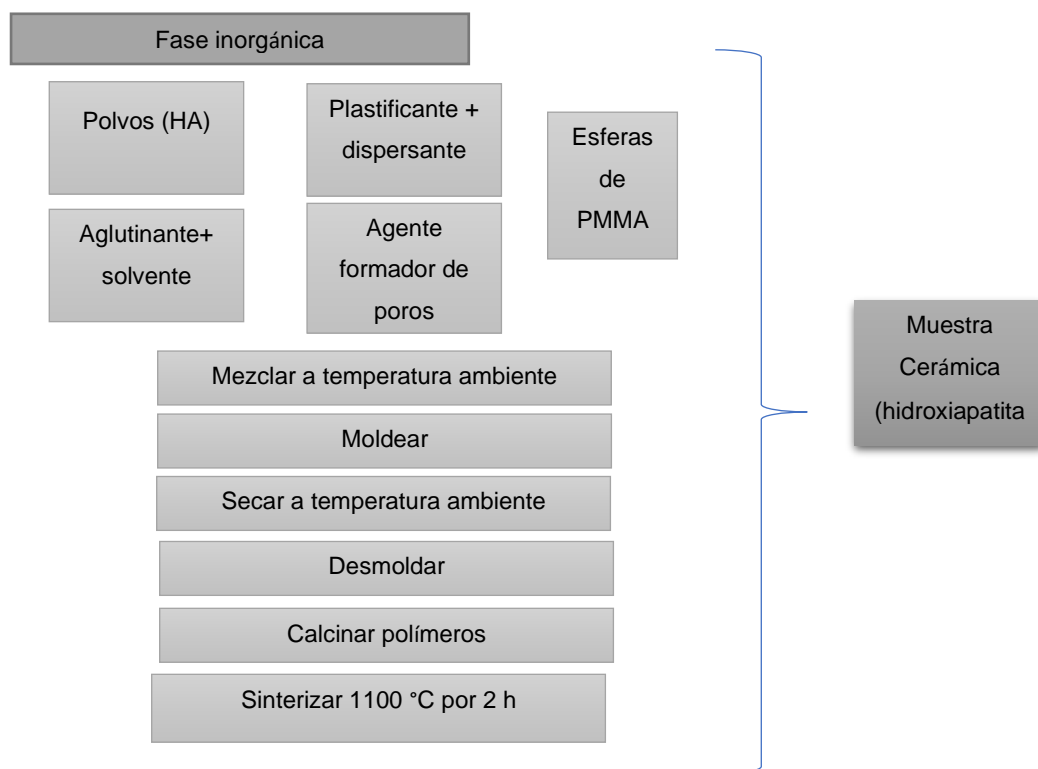
Procedimiento:

1. En un vaso de precipitado se agregó el solvente junto con el PVB y se mezcló por agitación magnética por 5 minutos hasta obtener una solución homogénea.
2. El PEG se pesó y se fundió en una parrilla de calentamiento; posteriormente se le añadió el APA.
3. Una vez mezclados el PEG y el APA, se incorporaron la solución del paso 1.
4. Se mezcla la HA con el ácido oxálico (Ac. Ox). Esta mezcla se añadió lentamente a las microesferas de polimetilmetacrilato, polibutilmetacrilato o polietilmetacrilato.
5. Por último, la solución del paso 3 se vierte a la mezcla de los polvos (paso 4) para obtener la pasta cerámica.
6. Se rellenan los moldes con la pasta cerámica utilizando una espátula. Se debe asegurar que la mezcla rellene los moldes totalmente; para

lograrlo, debe comprimirse la pasta con la ayuda de la espátula, un par de veces.

7. Se dejan secar las muestras en el molde a temperatura ambiente hasta que se evapore el EtOH. Durante este tiempo se lleva a cabo el fraguado y la formación de los microporos.
8. Una vez fraguadas se desmoldan las piezas, se guardan en cajas Petri y se etiquetan.
9. Al obtener las piezas se llevan a sinterización:
 - a) Las muestras se colocaron dentro de un crisol de alúmina.
 - b) Posteriormente se llevan a la mufla la cual incrementa la temperatura 1°C por minuto, hasta alcanzar los 1100 °C
 - c) Al llegar a 1100 °C se quedan por dos horas, esto permite que las partículas de HA se sintericen y los polímeros sean eliminados. El proceso dura aproximadamente 30 h, ya que para alcanzar los 1100°C se tarda 18.3 h, más las dos horas que se deja en esta temperatura, después se deja enfriar a temperatura ambiente.

En el esquema 1 se representan los pasos para la obtención de la fase inorgánica del PGCM.



Esquema 1. Preparación fase inorgánica

7.4. Adición del péptido de HACD1/CAP

Se realizó la dilución del péptido de HACD1/CAP en agua bidestilada, filtrada a 0.02 μm . Se tenía una dilución original de 14.5 μg en 200 μL (7.25 %).

Calculamos el volumen de cada pieza de HA. la cual correspondía a 450 mm^3 . Se tomaron 10 μL de la dilución original del péptido y se diluyeron en 140 μL , para un total 150 μL (0.48 %), esto para agregar 1 μL por cada mm^3 de volumen de las piezas de HA.

Posteriormente se agregó por goteo en 4 caras de las piezas de HA y se colocaron en una incubadora a 37 °C por 24 h.

7.5. Elaboración de Fase orgánica del proceso de Gel casting modificado

Se preparó de la siguiente forma:

1. Se pesó la cantidad de grenetina, que fue de 1.4 g.
2. En un vaso de precipitados se calentó 100 mL agua a 80 °C.
3. Agregamos la grenetina al agua hasta obtener una solución homogénea.
4. Se añadió por goteo la solución a las piezas de HA.
5. Se dejaron secar las piezas a temperatura ambiente.

El hecho de agregar grenetina o colágena como fase orgánica en el proceso ha demostrado mejorar las características físico-mecánicas del material (Alonso-Sierra et al., 2017).

7.6. Técnicas de caracterización

7.6.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Mediante esta técnica obtuvimos información estructural de las muestras y determinamos el tamaño y distribución de los poros en la HA.

Se empleó un microscopio electrónico de barrido (Hitachi SU8230) operado a 20 KV. Las piezas de HA fueron recubiertas con oro en un equipo Sputter Coater EMS 550, para mejorar la observación; se adhirieron al porta muestras del microscopio con tintura de plata para evitar que estas se movieran. Se usaron electrones secundarios para la obtención de las imágenes las cuales fueron tomadas a distintos aumentos para observar la morfología de los poros presentes en el material.

7.6.2. Espectroscopía por Dispersión de Energía de rayos X (EDS)

Permite realizar un análisis semicuantitativo elemental de la muestra, demostrando la distribución de un determinado elemento o de varios tipos de átomos en la muestra, estimando cualitativamente la abundancia y distribución de un elemento, también será posible analizar la relación Ca/P. Esta técnica la realizamos para saber si al agregar el pHACD1/CAP obtendríamos una relación Ca/P adecuada.

Las muestras se pulverizaron y adhirieron a un porta-muestras metálico, previamente pulido y limpio, utilizamos una cinta de carbón para fijarla. Se usó un microscopio electrónico de barrido marca Hitachi SU8230 con un voltaje de 20 Kv a 500X con detector Bruker XFlash 6/60.

7.6.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se basa en la absorción de la luz infrarroja por parte de las moléculas, la cual excita los enlaces presentes en las moléculas y provoca vibraciones en estos.

El espectro infrarrojo se traza de acuerdo con la inversa de la longitud de onda, cuya unidad son los cm^{-1} , que estará en el eje X, mientras que en el eje Y se encuentra el porcentaje de transmitancia, la cual estará determinada por la absorbancia que tuvo la molécula, en el caso de tener una transmitancia de 100 % se determinará que en esa región no hubo

absorbancia de la luz infrarroja, por lo que no hay moléculas presentes. Este espectro nos muestra la “huella digital” de lo que se pone a prueba.

Para su interpretación nos apoyamos en los reportes preexistentes en la literatura. La amplitud de cada banda es determinada por las interacciones químicas, si hay muchas interacciones el pico será muy amplio, cuando hay pocas interacciones, el pico será agudo. Por otro lado, la intensidad del pico estará relacionado con la concentración, entre más alta sea el pico será más intenso.

Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro Pekín Elmer, se usó un plato de cristal de diamante/ZnSe, en el rango del espectro infrarrojo de 400 a 4000 cm^{-1} .

Se prepararon las muestras con bromuro de potasio (KBr) para obtener pastillas y poder realizar la espectroscopía. Esto se realiza al moler las muestras junto con KBr, utilizando un mortero y un pistilo. Se toma alrededor de 1mg de la muestra triturada y se le agregan 100 mg de KBr. Posteriormente, se llevan a un troquel el cual ejerce una presión de entre 700 y 1000 kg/cm^2 .

El KBr funciona como “ventana” para poder realizar la espectroscopía, este compuesto no absorbe infrarrojo por encima de 400cm^{-1} , es uno de los compuestos más usados para poder observar los espectros.

Se colocan las pastillas de la muestra en el aparato y se hace incidir un haz infrarrojo, el cual producirá excitación en los enlaces presentes en la muestra que los hará vibrar de diferente forma y a distintas frecuencias.

7.6.4. Espectroscopía Raman

Para el análisis Raman se las muestras se trituraron usando un mortero y pistilo y pesaron para un análisis más detallado, se utilizó un espectrómetro Bruker Senterra (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.) para complementar los análisis de estructura química de todos los materiales compuestos. Las condiciones de operación durante todos los análisis fueron un voltaje de 100 mV, una resolución de número de onda de $3\text{-}5\text{ cm}^{-1}$, y un objetivo de 20.

7.6.5. Difracción de rayos X (XRD)

Permite determinar la estructura cristalina de las muestras y confirmar la fase cristalina que se obtuvo después de la síntesis. El XRD requirió la pulverización de las muestras para después ser analizadas en un difractómetro miniflex Rigaku UIV. Las muestras se colocaron en un porta muestras Porton Zero Background Holder. La identificación se lleva a cabo con un archivo de datos de referencia de difracción de polvos (PDF) proporcionado por el Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD).

7.7. Modelo *in silico* de docking molecular entre hidroxiapatita y pHACD1/CAP

El docking es una simulación molecular por computadora que permite analizar el comportamiento de un sistema, físico, químico o biológico a lo largo del tiempo, para lo cual se calcula las fuerzas entre los átomos que lo conforman.

El análisis de docking molecular fue realizado con el programa informático Autodoc Vina®, para dilucidar el posible mecanismo de interacción entre pHACD1/CAP y un cristal de HA. Para dicho fin se utilizó un cristal HA en celda unitaria obtenido de la base de datos Zinc (<https://zinc.docking.org/>) y el modelo tridimensional de pHACD1/CAP se realizó mediante el servidor i-Tasser (<https://zhangroup.org>). El resultado del docking se visualizó con el programa UCSF-CHIMERA®.

La caja de simulación fue definida a mano abarcando el total de la superficie del péptido. Al péptido se le añaden los hidrógenos usando UCSF Chimera eligiendo los estados de protonación a pH neutro con base en los valores de pKa estándar. Números de modos de unión son 10, exhaustividad de 8, y diferencia de energía máxima de 3 kcal/mol.

A la estructura elegida se le hizo una minimización de energía usando el campo de fuerza AMBER ff14SB: STEPS: 100; Steepest descent: 100. Las conformaciones de los rotámeros cambiaron significativamente, pero no la estructura global. Se evaluaron choques estéricos, rotámeros, cargas y ángulos diedros en el gráfico de Ramachandran usando el programa MolProbity del servidor de Duke University.

Finalmente, el servidor i-Tasser usa una base de datos de proteínas, cuya estructura tridimensional ha sido resuelta (PDB) y se realizó un empalme por homología de secuencia con el pHACD1/CAP (VSFPSCCFSIIVIFM).

8. Resultados

8.1. Obtención de muestras

Lo primero que obtuvimos fueron las muestras después de la fase inorgánica de PGCM. Un punto crítico de este paso es el desmoldado después de la sinterización de las muestras, debido a que aún no se les agregaba la fase orgánica, por lo que las muestras eran frágiles y al aplicar demasiada presión se podían fragmentar.

En la imagen 8 se observan las muestras modeladas mediante el gel-casting modificado, cumpliendo el objetivo de obtener muestras con las características planteadas.

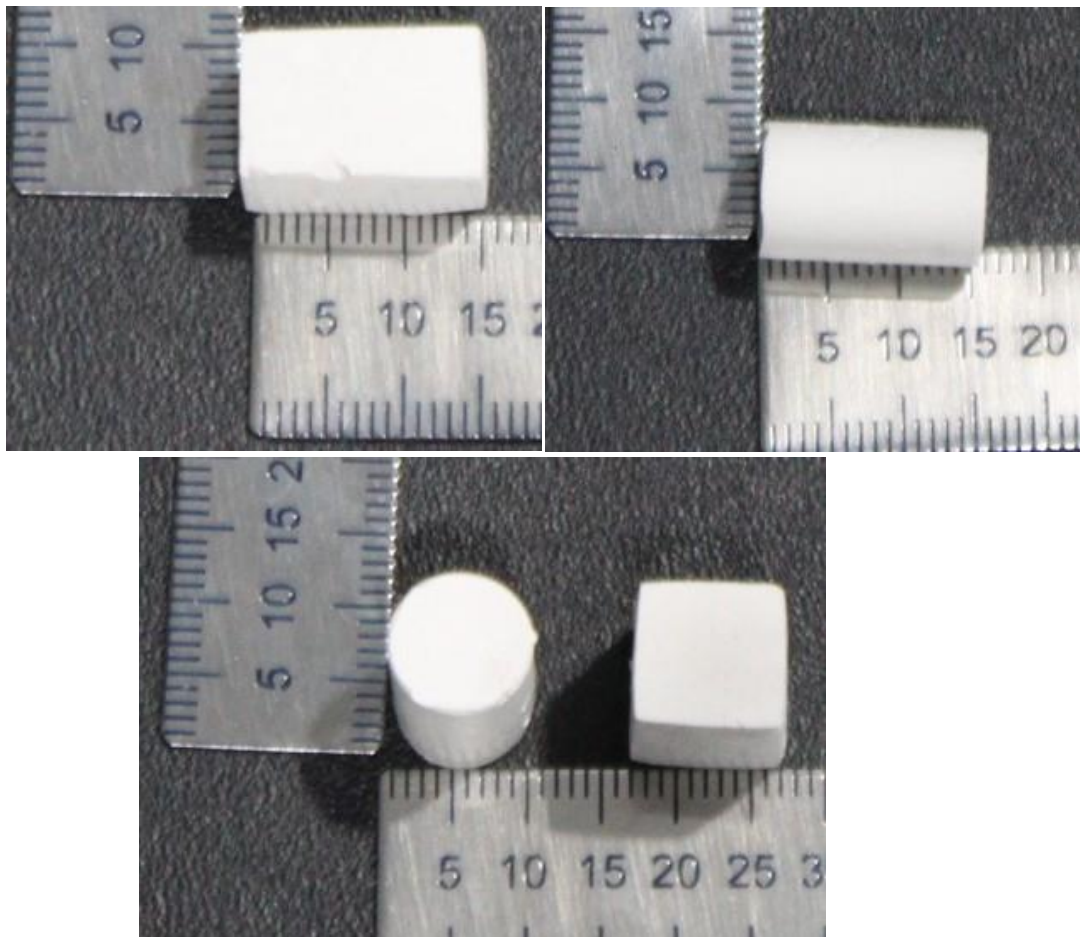


Imagen 8. Muestras moldeadas por PGCM. prismas rectangulares y cilíndricos de hidroxiapatita

8.2. Microscopía electrónica de barrido

8.2.2. PEMA y PMMA

En la imagen 9 se muestran diferentes micrografías de las piezas de HA a las que se les colocó PEMA y PMMA como agentes formadores de poros previo al proceso de sinterizado (a, b y c) y posterior a este (d, e y f).

PEMA+PMMA

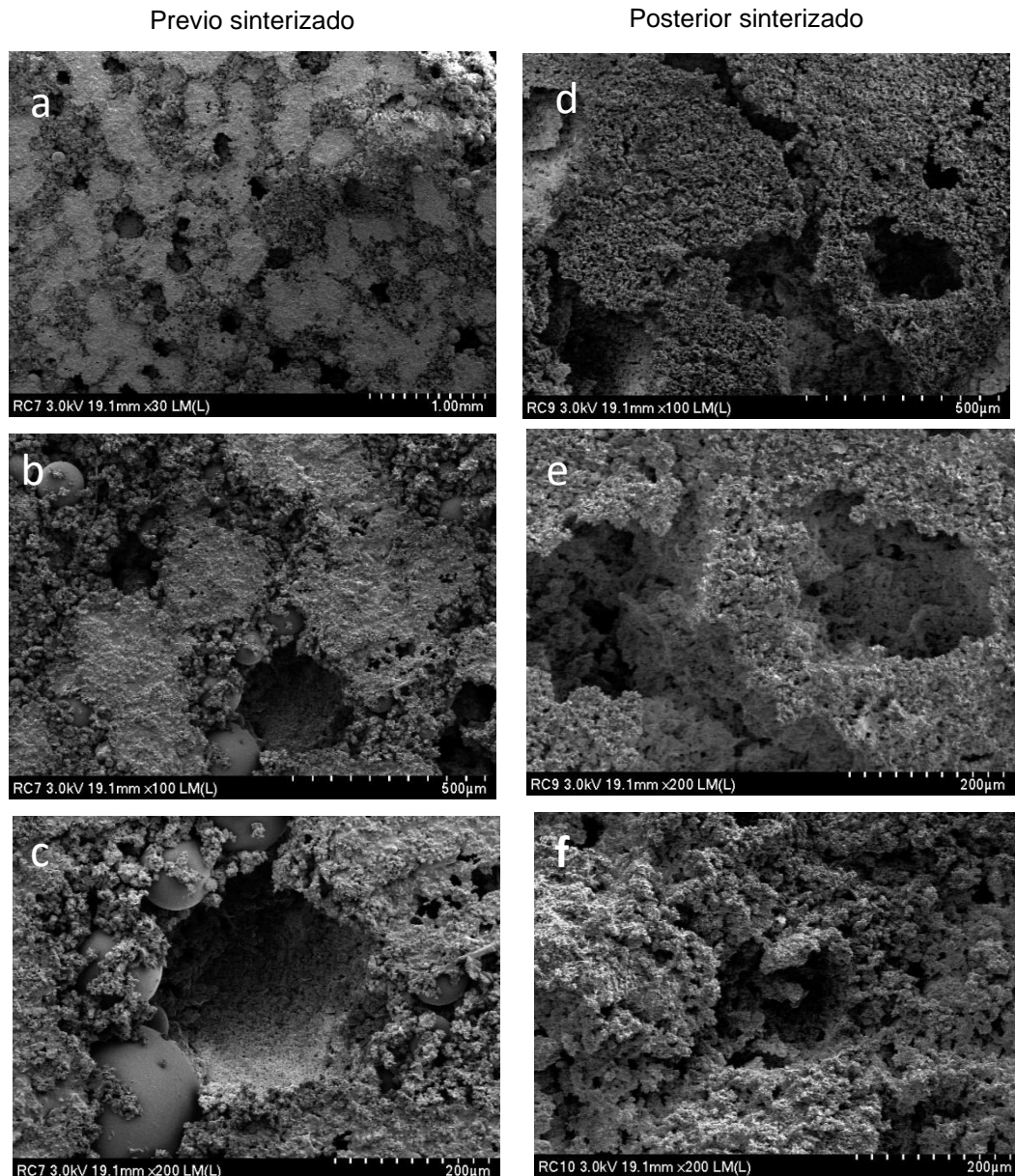


Imagen 9. Micrografías de piezas de hidroxiapatita elaboradas con PEMA y PMMA antes y después del sinterizado. a, b y c, muestras antes del sinterizado. d, e y f muestras después del sinterizado

En la imagen 9 a, b y c previo al sinterizado, se pueden observar espacios correspondientes a PEMA mayores a $100\mu\text{m}$, desprendidas al momento de preparación de la muestra (a). A $100\times$ se visualizan microesferas de PMMA y PEMA de ~ 50 y $200\mu\text{m}$ respectivamente. (b) En la micrografía a $200\times$ donde se observa una mayor amplificación, uno de los espacios ocasionados por las microesferas de PEMA es de $\sim 200\mu\text{m}$, se visualizan microesferas de PMMA más pequeñas de $\sim 50\mu\text{m}$ (c). En "d" podemos observar poros de $300\mu\text{m}$, así como poros $\sim 50\mu\text{m}$. Además, dentro de los poros de mayor dimensión se encuentran poros pequeños que representan interconexión de los poros. En "e" a $200\times$ observamos poros de $\sim 300\mu\text{m}$ con poros en su interior (interconexión). En "f" observamos a $200\times$ donde se localiza otra región con poros más pequeños $\sim 50\mu\text{m}$.

8.2.3. PBMA y PMMA

En la imagen 10 se presentan micrografía obtenidas antes de la sinterización (a, b y c) y posterior a esta (d, e y f) de muestras elaboradas con la combinación de PBMA y PMMA.

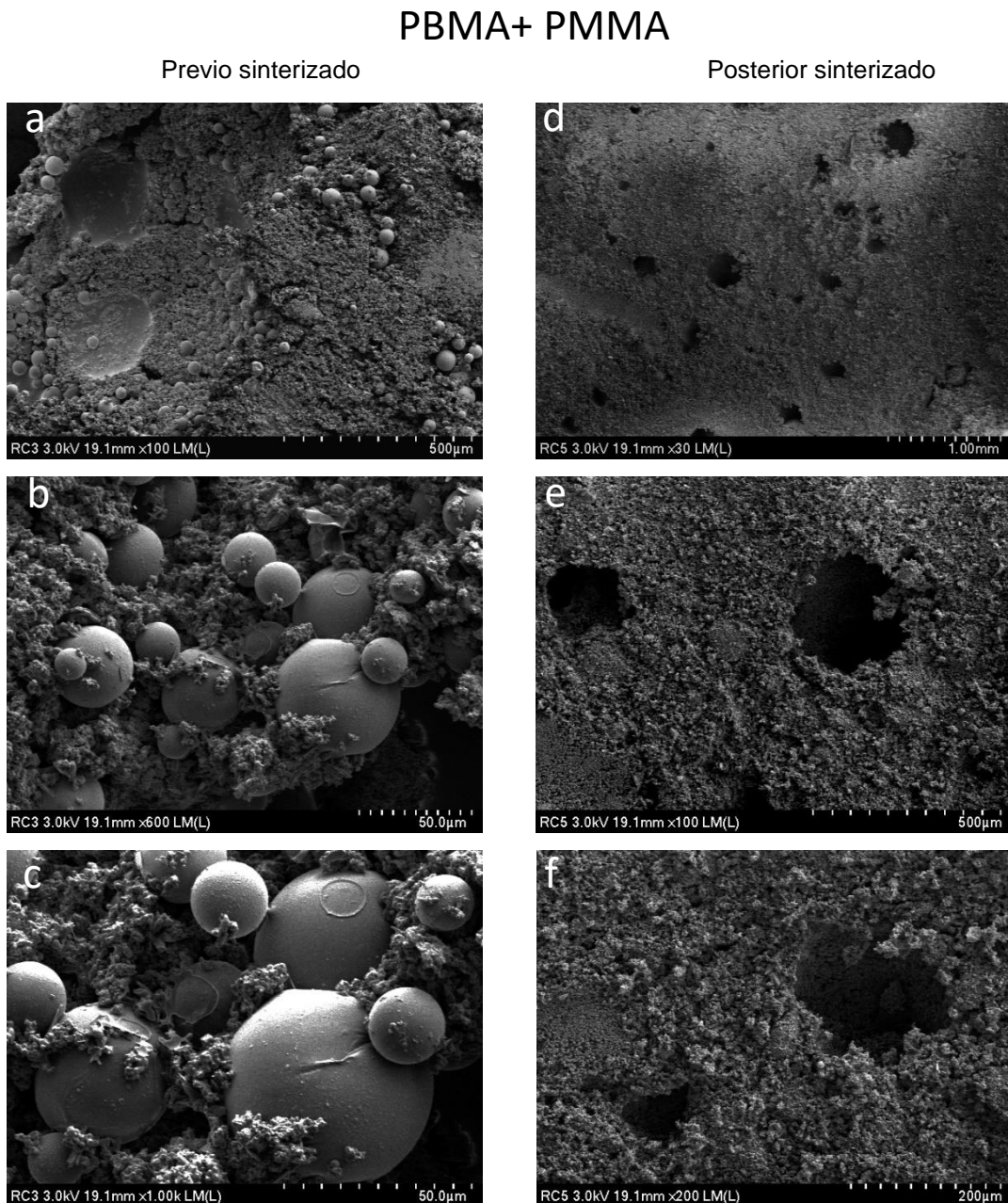


Imagen 10. Muestras realizadas con PBM + PMMA a, b y c, muestras antes del sinterizado. d, e y f muestras después del sinterizado

En a, b y c observamos micrografías de las muestras previo al sinterizado a 100x, 600x y 1000x. aquí se aprecian microsferas de PBMA y PMMA de un tamaño aproximado ~ de 50-25 μm . En d, e y f a 30x, 100x y 200x observamos porosidades ~ 200, 50, 25 μm .

8.2.4. PMMA

Finalmente presentamos imágenes de HA en la que sólo se usó PMMA como agente formador de poros (imagen 11), al finalizar la sinterización de las muestras.

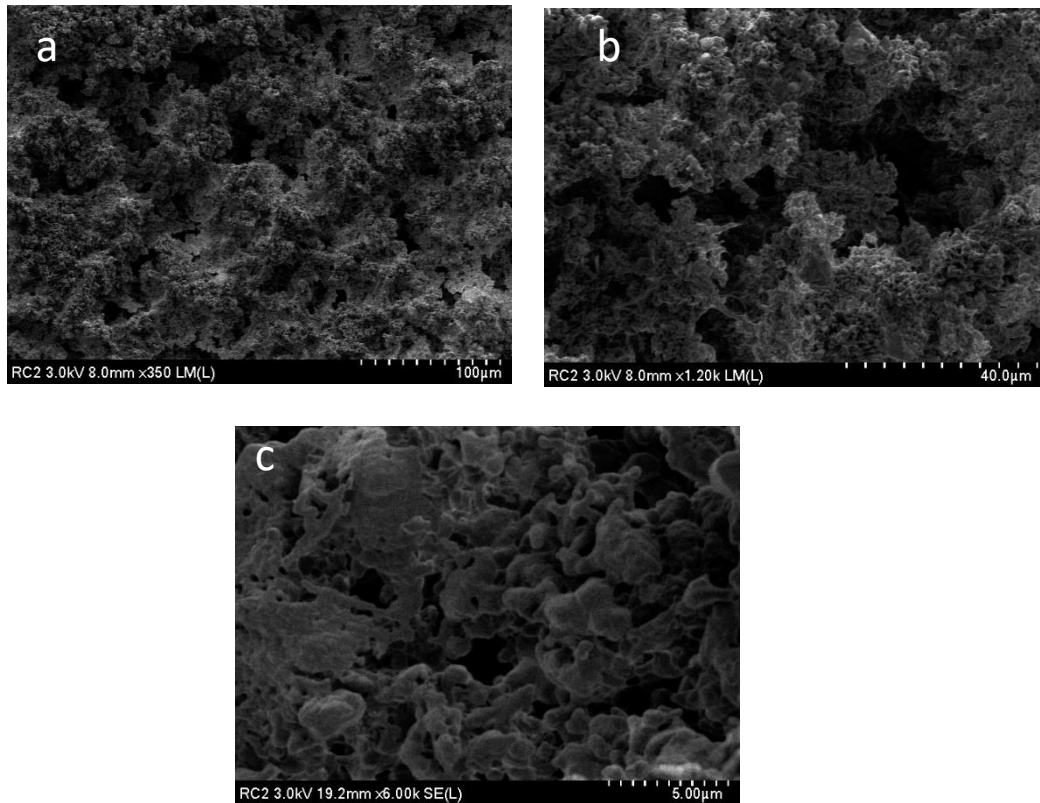


Imagen 11. Micrografías de piezas de hidroxiapatita elaboradas con PMMA después del proceso de sinterizado

En estas imágenes utilizamos aumentos de 350x(a), 1200x(b) y 5000x(c) se aprecian poros de 5 hasta ~ 40 µm.

De todas estas imágenes visualizamos que las esferas de diferentes polímeros usadas para la formación de poros fueron calcinadas durante el proceso de sinterización que deja los poros del tamaño de los diferentes polímeros, además de notar el proceso de unión entre las diferentes partículas de HA.

De estas opciones decidimos trabajar con la combinación de PEMA y PMMA ya que nos permitió obtener porosidades de diferentes tamaños que pueden

tener una adecuada función biológica. Por esto, la adición de pHACD1/CAP se hizo sobre piezas realizadas con esta combinación.

8.3.4. Hidroxiapatita adicionada con péptido

En la imagen 12 paneles a, b, c y d visualizamos aumentos a 1000x, 5000x, 10000x, y 40000x respectivamente, después de añadir el péptido a los andamios de HA. Podemos apreciar que el añadir el péptido no genera alguna variación en la superficie de la HA.

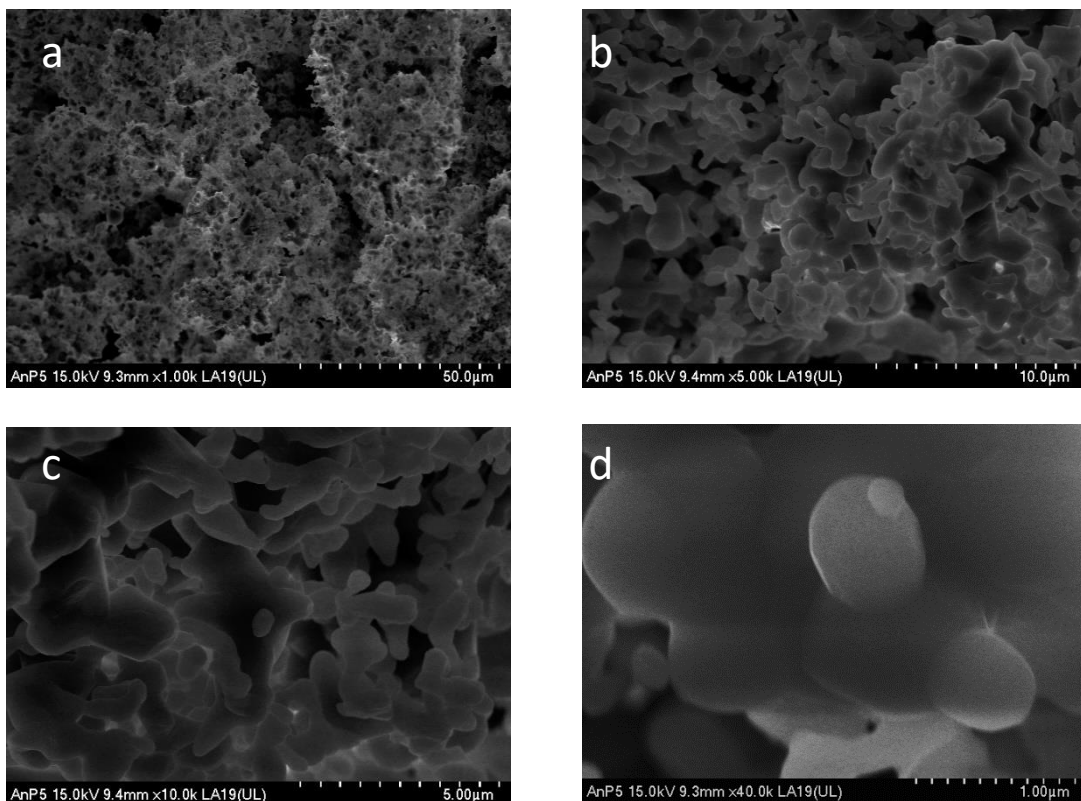


Imagen 12. Micrografías de piezas de hidroxiapatita con pHACD1/CAP

8.4. EDS

En la imagen 13 se observan los resultados del EDS de la hidroxiapatita obtenida por PGCM que contenía pHACD1/CAP.

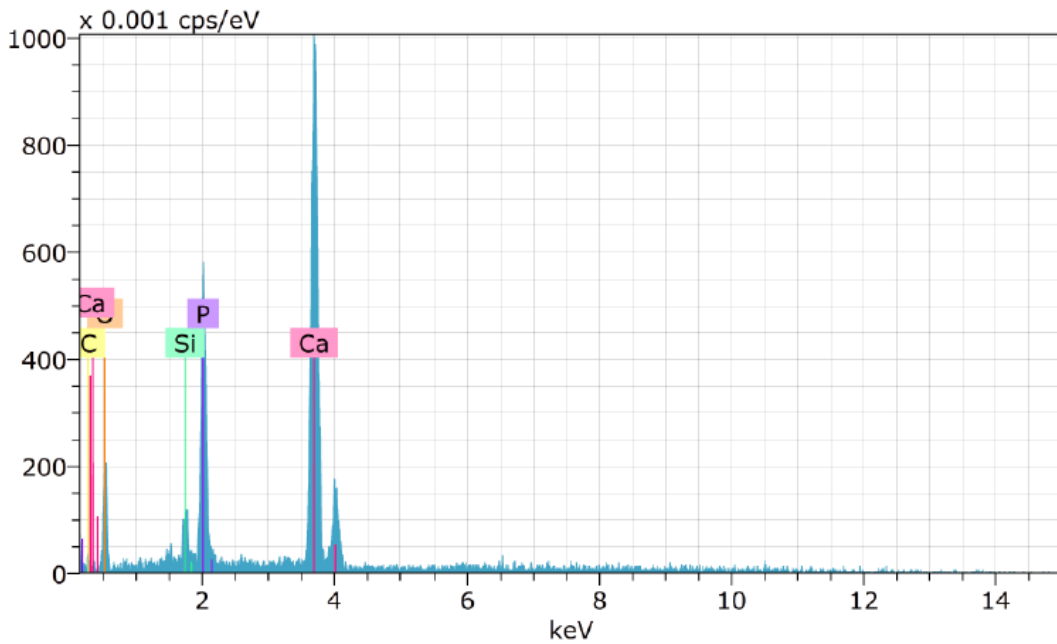


Imagen 13. Espectro EDS de HA con pHACD1/CAP

En la tabla 3 se muestran el porcentaje de elementos que se pueden detectar mediante esta técnica.

Elemento	% atómico	% peso
C	3.62	1.73
O	49.96	31.77
Si	3.11	3.47
P	16.45	20.25
Ca	26.86	42.78
	Ca/P	1.632

Tabla 3. Elementos encontrados en el material mediante EDS.

La técnica nos permitió conocer la relación atómica Ca/P de 1.632 considerando los % atómicos.

8.5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

- Espectro de pHACD1/CAP de 15 aminoácidos.

En la imagen 14, se presenta el espectro FTIR del péptido de HACD1/CAP

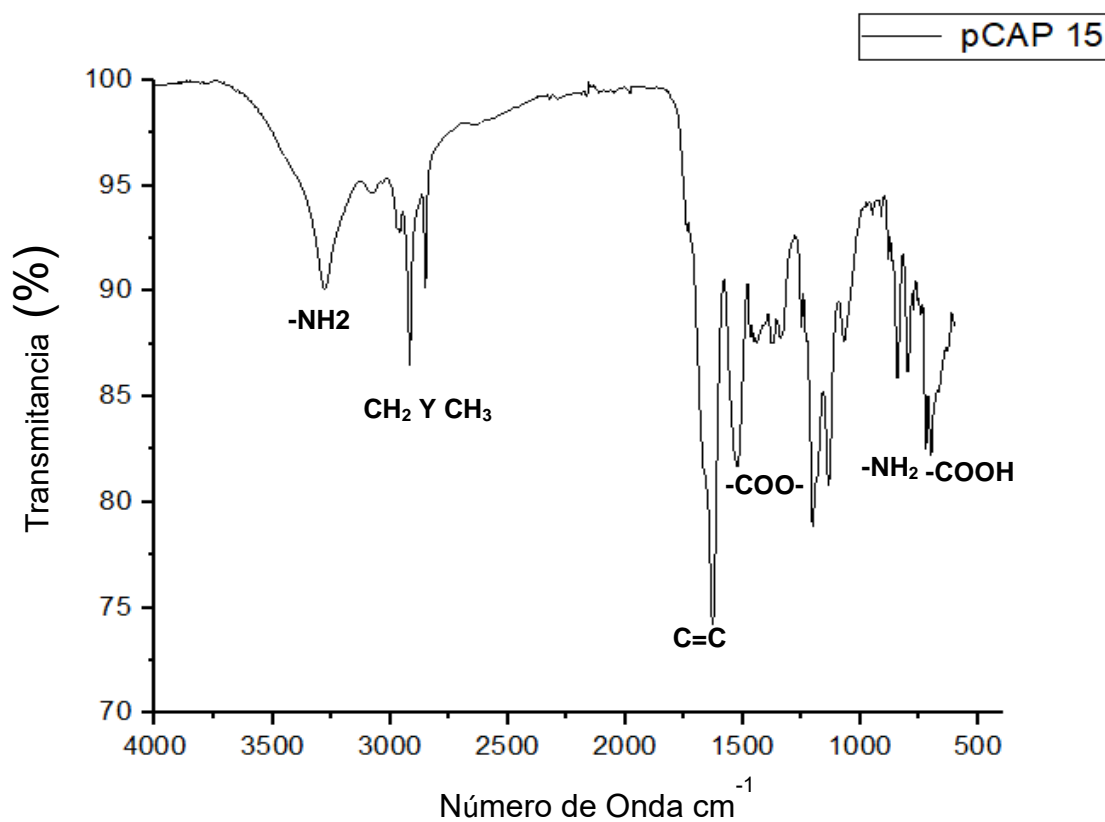


Imagen 14 Espectro FTIR de pHACD1/CAP

Se encuentran bandas atribuidas a grupos carboxilo y amina pertenecientes al péptido. También visualizamos grupos metilo (CH₃) y metileno (CH₂).

- **Espectro Hidroxiapatita.**

presenta el espectro de los polvos de hidroxiapatita de la casa comercial Sigma Aldrich® usados en el proceso. Este espectro nos sirvió como control permitiéndonos identificar los cambios que se presentan conforme se llevan a cabo las diferentes etapas del PGCM.

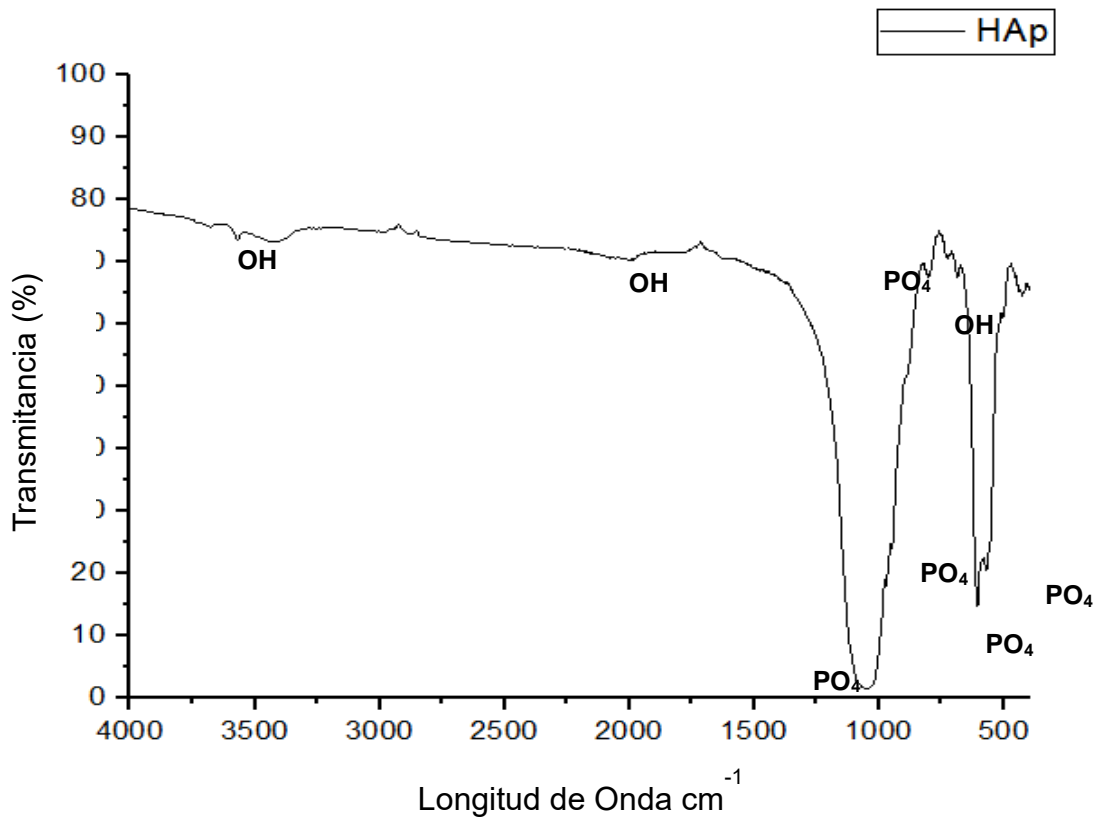


Imagen 15. Espectro FTIR de HA.

En el caso de la hidroxiapatita, se cuenta con información de las bandas típicas presentes el material, estas son las siguientes:

- $\sim 1033 \text{ cm}^{-1}$ presenta una banda ancha e intensa corresponde al grupo fosfato (PO_4^{3-}).
- $\sim 962 \text{ cm}^{-1}$ se presentan estiramientos simétricos de los enlaces P-O
- ~ 630 y 3570 cm^{-1} atribuidos al grupo hidroxilo
- ~ 563 y 600 cm^{-1} son bandas originadas por la deformación del grupo PO_4^{3-}

- **Espectro de las muestras después del sinterizado.**

Se hizo la espectroscopía FTIR después del sinterizado de las muestras, donde los diferentes reactivos utilizados para obtener las piezas son calcinados y las partículas de HA sufren una especie de “fusión”. El espectro de la hidroxiapatita obtenido después del sinterizado (imagen 16):

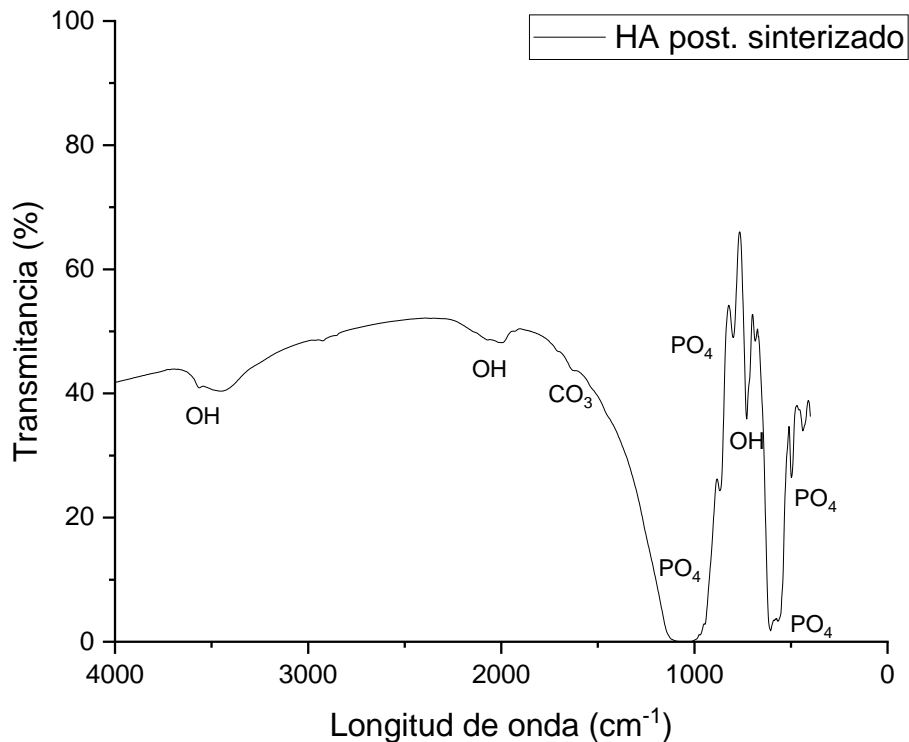


Imagen 16. Espectro FTIR. Material después del sinterizado

Como se puede observar, las bandas que presenta el espectro después del sinterizado son prácticamente iguales a las que se presentan en el espectro FTIR de la imagen 16, están presentes bandas que corresponden al espectro de la HA.

Posteriormente se realizó la espectroscopía FTIR de la HA con grenetina.

- **Hidroxiapatita + grenetina**

Al agregar la grenetina durante el proceso se obtuvo el siguiente espectro (imagen 17).

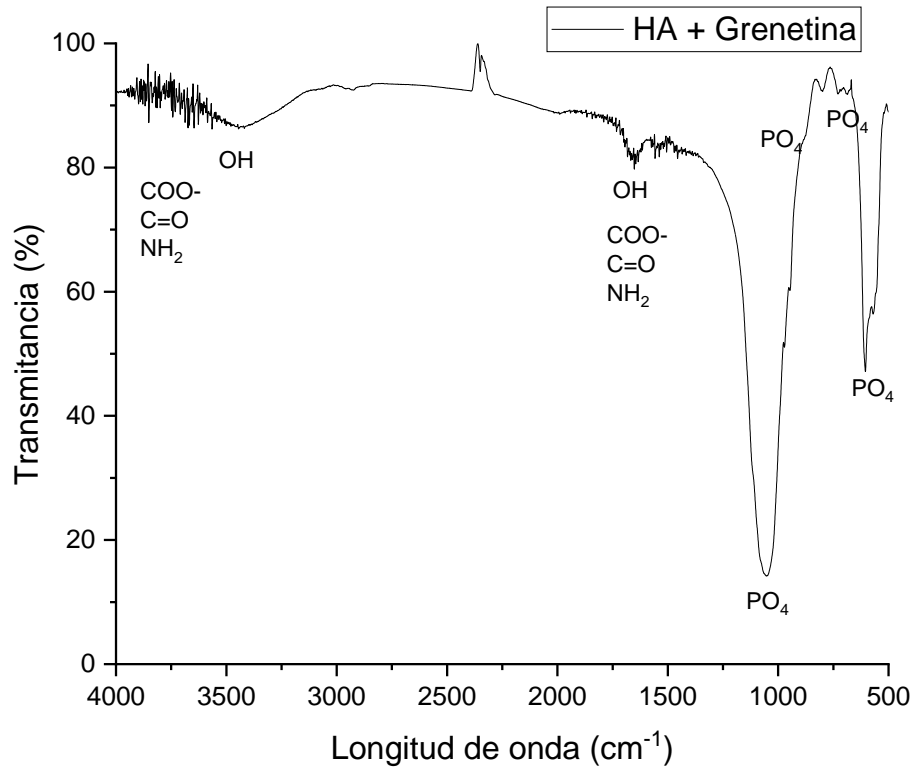


Imagen 17. Espectro FTIR. HA con grenetina.

Se observa presencia de una banda que corresponde a una vibración en el enlace C=O que corresponde a grupos Amida I.

- **Hidroxiapatita + pHACD1/CAP**

El espectro FTIR del material al añadir el pHACD1/CAP por adsorción, se presenta en la imagen 18.

En el espectro se observan las bandas presentes en la HA como:

PO_4 ~1042, ~805, ~611-569 y ~421 y OH ~3710 y ~710.

Además, se aprecia un grupo de bandas pequeñas ~1881-1390 que corresponden a las vibraciones de los enlaces NH_2 , $\text{C}=\text{C}$, COO^- , $\text{C}=\text{O}$, presentes en el péptido, lo que nos permite deducir la presencia de este en el material.

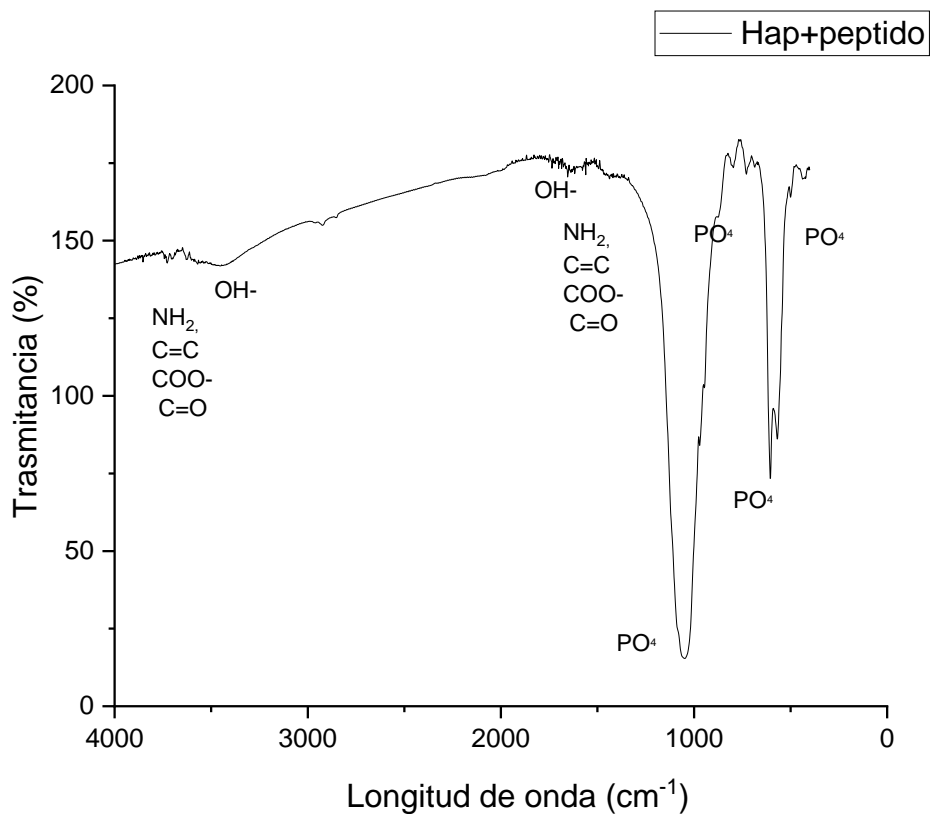


Imagen 18. Espectro FTIR Hidroxiapatita + péptido HACD1/CAP

8.6. Espectroscopía RAMAN

8.6.1. HA con grenetina

En la imagen 19 se presenta el espectro Raman de HA con grenetina, donde se observan las bandas típicas de la HA. El pico $\sim 974 \text{ cm}^{-1}$ se asocia al modo vibracional del estiramiento simétrico del grupo PO_4 (enlace P-O), se aprecian dos picos de baja intensidad a 406 y 610 cm^{-1} asociados a la flexión de PO_4 (enlace O-P-O) y un pico a 1324 cm^{-1} asociado al estiramiento asimétrico de PO_4 (enlace P-O). También se presentaron señales a un lado de pico más alto, entre ~ 1000 - 1200 que pueden representar estiramientos de los enlaces de P-O.

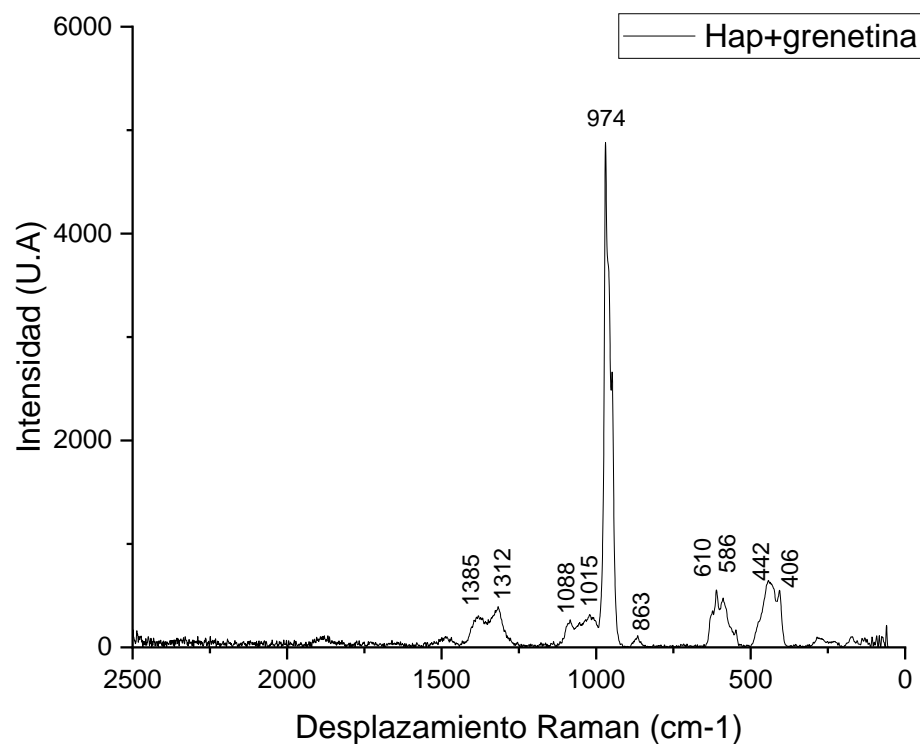


Imagen 19. Espectro Raman Hidroxiapatita + grenetina

8.6.2. HA con pHACD1/CAP

Observamos un pico $\sim 976 \text{ cm}^{-1}$ que representa el estiramiento simétrico del grupo PO_4 (enlace P-O), también se aprecian dos picos de baja intensidad entre 360 y 615 cm^{-1} asociados a la flexión del grupo PO_4 (enlace O-P-O), el conjunto de picos a 1079 , 1316 y 1386 cm^{-1} se asocia al estiramiento asimétrico 3 de PO_4 (enlace P-O). En la imagen 20 se presenta el espectro Raman de HA con pHACD1/CAP.

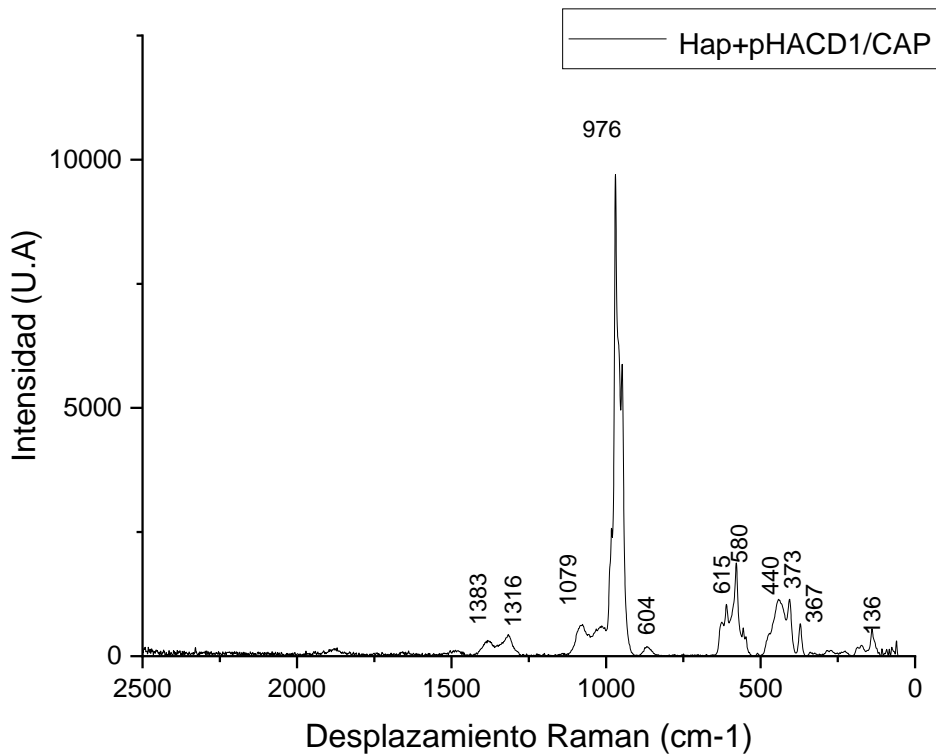


Imagen 20. Espectro Raman Hidroxiapatita + pHACD1CAP

El pico $\sim 976 \text{ cm}^{-1}$ se corresponde al estiramiento simétrico del grupo PO_4 (enlace P-O), también se aprecian dos picos de baja intensidad a 410 y 615 cm^{-1} asociados a la flexión de PO_4 (enlace O-P-O) y un pico a 1324 cm^{-1} asociado al modo de estiramiento asimétrico 3 de PO_4 (enlace P-O). también se aprecian señales a un lado de pico más alto, entre ~ 1000 - 1200 que pueden representar estiramientos de los enlaces de P-O

Podemos observar que este espectro presenta algunas diferencias con el de HA con grenetina, siendo más evidente que los picos de 1316 y 1383

cm^{-1} disminuyeron su intensidad y los picos entre 367 y 615 cm^{-1} parecen haber aumentado, sobre todo a 580 cm^{-1} .

8.7. Difracción de rayos X (XRD)

Presentamos difractogramas del polvo de HA previo al PGCM y de la HA al finalizar el PGCM junto con el péptido. Para su interpretación se usó el PDF JCPDS 09-0432. En la imagen 21 se presenta el difractograma de la HA inicial usada en este estudio.

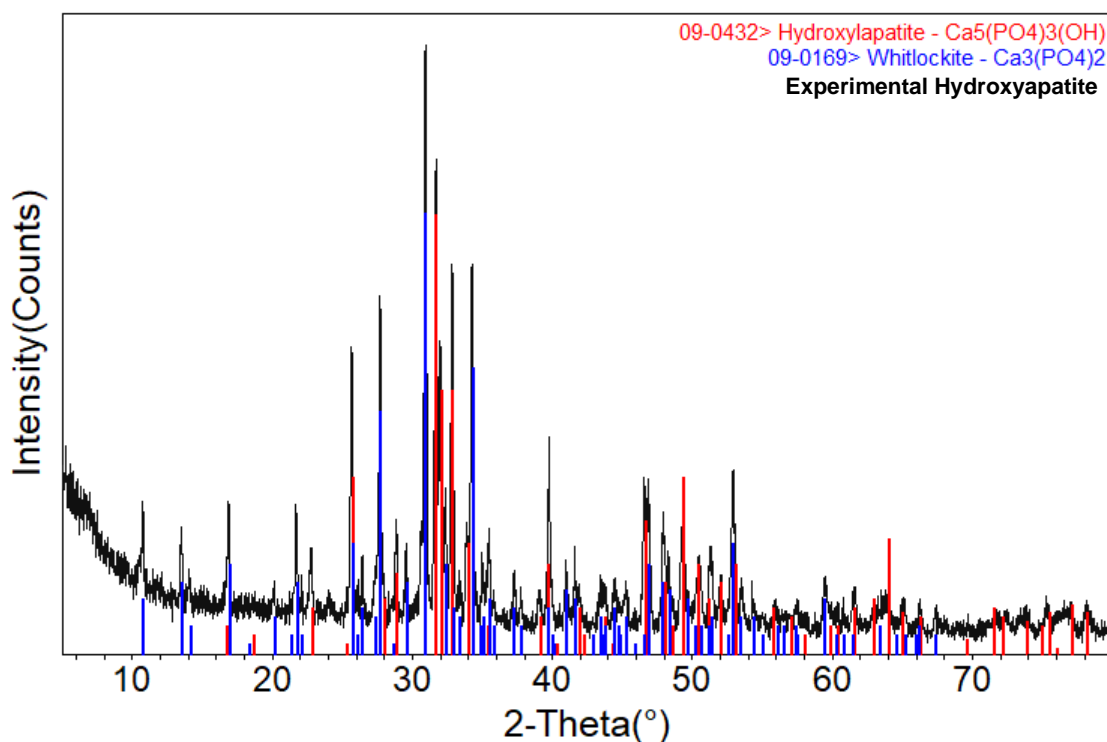


Imagen 21. Difractograma de la hidroxiapatita inicial. Bandas rojas correspondientes a hidroxiapatita de las tablas PDF 09-0432, Bandas azules correspondientes a Withlockita de las tablas 09-0169

En el difractograma se presentan en color negro los picos obtenidos de las muestras de hidroxiapatita, al hacer comparación contra las tablas PDF JCPDS 09-0432, marcadas en rojo, además de bandas correspondientes a hidroxiapatita están presentes bandas correspondientes a Withlockita, de acuerdo con el PDF JCPDS 09-0169. En este difractograma las bandas correspondientes a hidroxiapatita son las más intensas.

En la imagen 22 presentamos el difractograma de la HA después del PGCM y al agregarle el péptido.

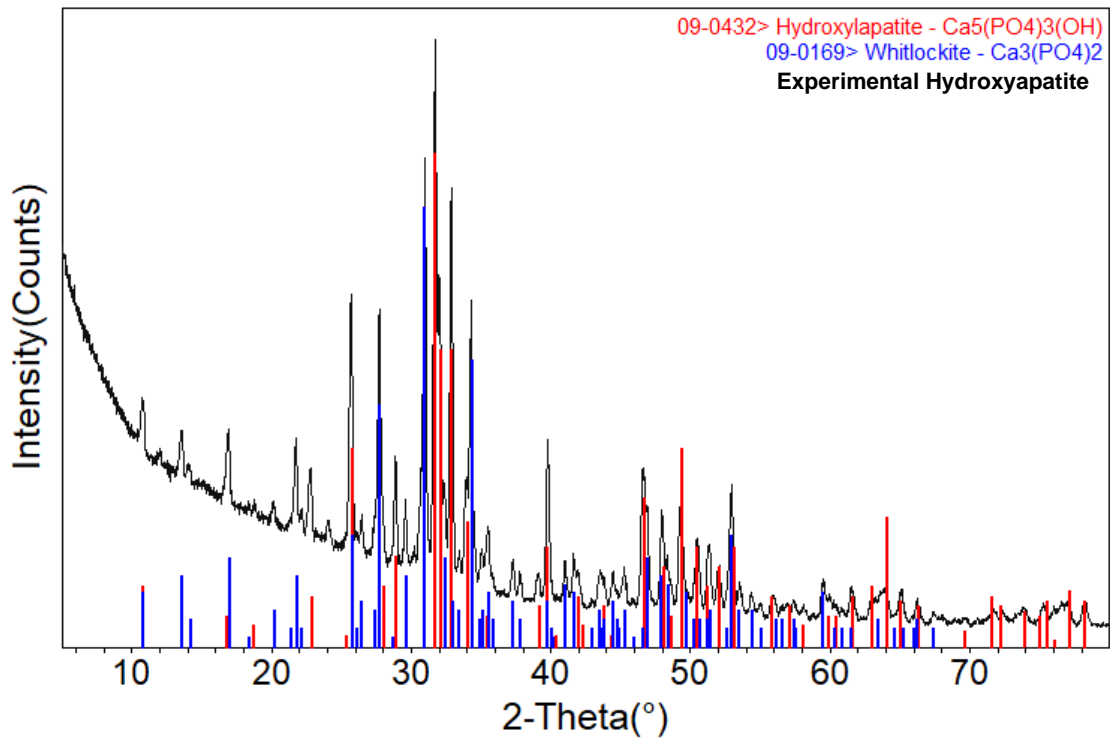


Imagen 22. Difractograma de hidroxiapatita después del PGCM y de añadir el pHACD1/CAP
 Bandas rojas correspondientes a hidroxiapatita de las tablas PDF 09-0432, Bandas azules correspondientes a Withlockita de las tablas 09-0169

En este difractograma los picos correspondientes a la whitlockita aumentan su intensidad, ocasionada por el sinterizado al cual fueron sometidas las muestras.

De esto podemos concluir que la fase mineral no se ve afectada al agregar péptido de HACD1/CAP.

8.8. Modelo *in silico*

8.8.1. Cristal de hidroxiapatita

El modelo *in silico* del cristal de HA se presenta en la imagen 26 .

Las esferas de color verde representan a los átomos de calcio (Ca) dentro de la molécula del cristal de HA, las esferas de color rojo son los átomos de oxígeno de los grupos OH y los bastones de color amarillo con rojo son los grupos fosfatos (PO_4). Hay que recordar que, estos diferentes iones y grupos funcionales tienen diferente tipo de carga lo cual determinará su interacción con la molécula de pHACD1/CAP, el Ca tiene carga positiva, mientras que los OH y PO_4 tienen carga negativa.

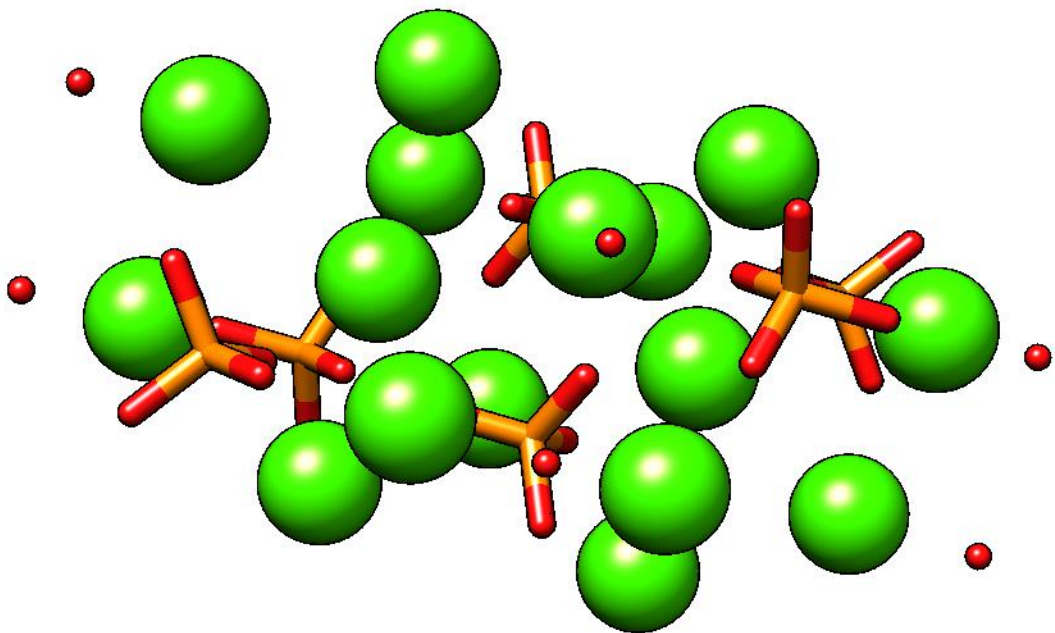


Imagen 26. Imagen de la hidroxiapatita diseñada mediante Autodoc Vina

8.8.2. Modelo de pHACD1/CAP

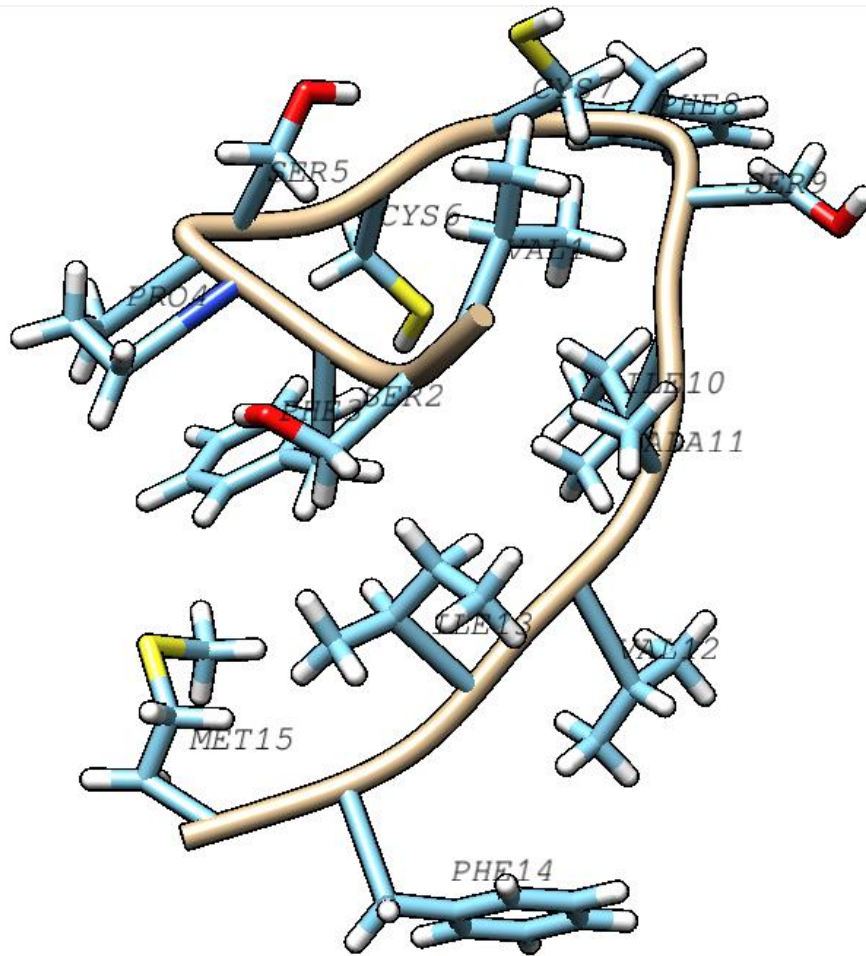


Imagen 27. Modelo *in silico* de pHACD1/CAP

En la imagen 27 observamos el modelo tridimensional del pHACD1/CAP. El 100 % de la estructura secundaria es no repetitiva (tubo café), mientras que las cadenas laterales se presentan en azul. La secuencia de aminoácidos nos indica que el 66 % del péptido está formado por aminoácidos hidrofóbicos y solo las serinas y cisteínas son polares sin carga.

VSFPSCCF**S**I**A**V**I**F**M**, los aminoácidos en rojo tienen naturaleza apolar, mientras que los aminoácidos marcados en negro (serinas y cisteínas) son polares sin carga que podrían tener interacción con la HA, esto debido a que presentan grupos funcionales como el grupo OH- de las serinas y sulfhídrido, en el caso de las cisteínas (SH).

8.8.3. Docking molecular entre hidroxiapatita y pHACD1/CAP

El análisis de docking molecular entre el cristal de HA y pHACD1/CAP en condiciones de vacío, arrojó diez posibles modelos de interacción entre ambas moléculas. En la tabla 4 se enlistan los diferentes puntajes, así como los valores RMSD (desviación cuadrática media de las posiciones atómicas), RMSD l.b (low bound o límite inferior) y RMSD u.b. (upper bound o límite superior). Los modelos remarcados con verde son aquellos que se tomaron en cuenta en este trabajo.

Los valores bajos de l.b RMSD obedecen a condiciones energéticamente más favorables, es decir interacciones donde el gasto energético sea mínimo para que la interacción pueda suceder de manera espontánea.

Puntaje	RMSD l.b.	RMSD u.b.
-4.3	0.0	0.0
-4.0	2.47	9.032
-3.7	3.01	8.57
-3.6	6.014	10.585
-3.6	3.866	6.657
-3.6	10.726	15.743
-3.5	2.657	7.152
-3.5	12.226	17.111
-3.5	11.599	14.332
-3.4	2.266	6.94

Tabla 4. Diferentes modelos de asociación entre las dos moléculas,

Para identificar la interacción más favorable entre el cristal de HA y pHACD1/CAP, además los valores de RMSD, se analizaron los diez modelos de interacción (proximidad de serinas y cisteínas con el cristal, distancias atómicas y número de interacciones atómicas de cada una de las posibilidades). Se seleccionaron los modelos de RMSD l.b / u.b 0 / 0 y 2.47 / 9.0 como mejores candidatos que permiten explicar la interacción entre ambas moléculas.

Modelo con valores de RMSD de 0

Se presenta en la imagen 28, en donde para una mejor visualización, se ocultaron las cadenas laterales de los aminoácidos apolares y sin

interacción con el cristal de HA, las zonas rojas del péptido corresponden a los aminoácidos apolares, las rosas a las cisteínas y las azules a las serinas. En este modelo, de las 3 serinas, sólo la serina de la posición 2 tuvo interacción con los átomos de HA.

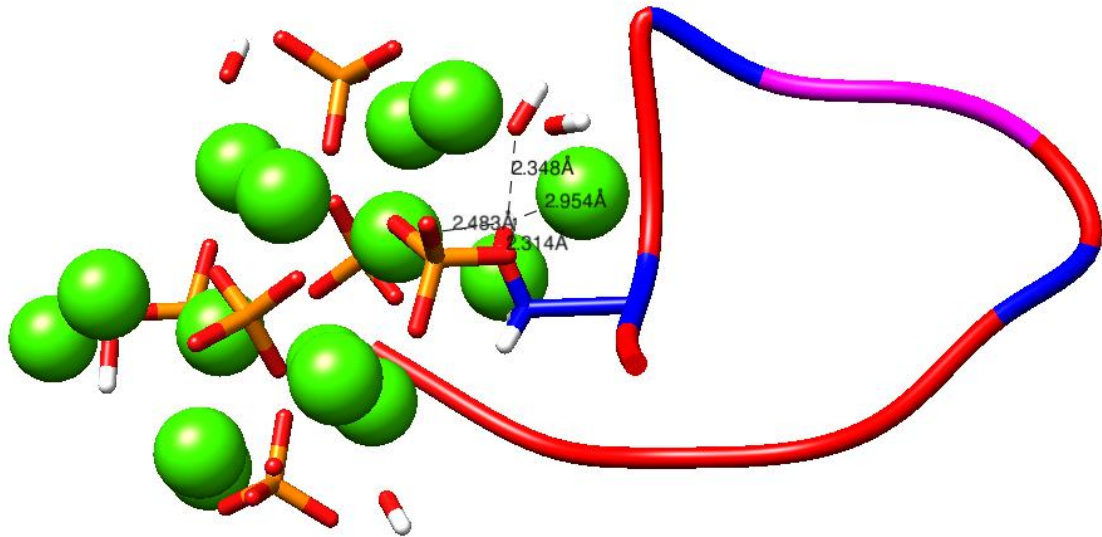


Imagen 28. Modelo con valores de RMSD de 0 de la interacción entre HA y pHACD1/CAP

En la literatura se ha informado que, distancias interatómicas de $\sim 2-3$ Å podrían representar interacciones electrostáticas entre átomos de distintas moléculas (Wang et al., 2017). Se realizaron mediciones entre el grupo OH de la serina de la posición 2 con los átomos de la HA. La distancia con el átomo de calcio cercano fue de 2.3 Å, la interacción se puede deber a fuerzas de Van der Waals. El siguiente átomo en proximidad es un oxígeno de un grupo hidroxilo de la HA a 2.34 Å, en este caso es posible la formación de un puente de hidrógeno.

Modelo RMSD I.b./u.b. 2.47/9.032

En este modelo, las serinas de la posición 2 y 5 tienen distancias interatómicas con el cristal de HA que permiten la interacción (imagen 29). Al igual que en el modelo anterior, solo se presentan las cadenas laterales de los aminoácidos con posibilidad de interacción con la HA.

El átomo más cercano para la serina 2 es un calcio a una distancia de 2.47 Å y el siguiente átomo más cercano es un oxígeno de un grupo fosfato (área roja de los bastones rojo con amarillo).

Para la serina 5 el átomo más cercano es un hidrógeno de un grupo OH de la HA a 3.5 Å, le sigue un átomo de calcio a 3.89 Å (podría representar interacción de Van der Waals) y finalmente, un átomo de oxígeno de un grupo OH de la HA a 3.922 Å (podría ser un puente de hidrógeno). Este modelo presenta dos posibles interacciones simultaneas entre las serinas de posición 2 y 5 hacia la HA.

Los hallazgos de estos dos modelos muestran que el péptido, pese a su naturaleza mayormente apolar, puede tener una asociación con la HA mediante las serinas.

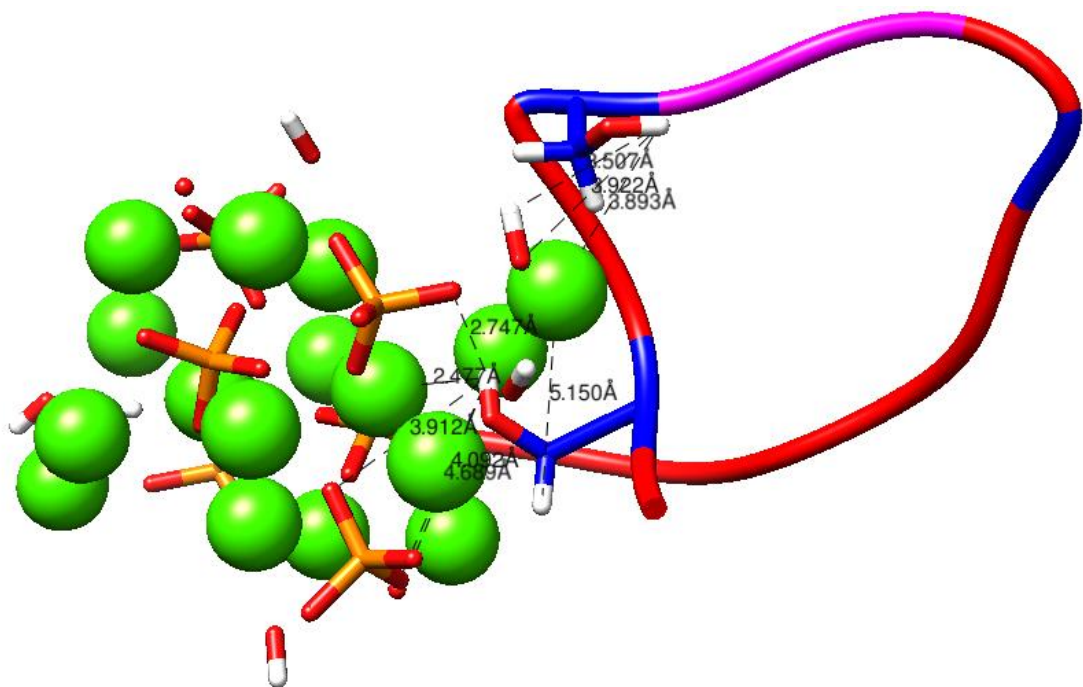


Imagen 29. Modelo con valores de RMSD de 2.47/9.032(l.b./u.b.) de la interacción entre HA y pHACD1/CAP

9. Discusión

El estándar de oro dentro de los biomateriales para la regeneración ósea es el injerto autólogo, sin embargo, tiene diferentes inconvenientes (obtención limitada, edad del individuo, necesidad de dos sitios quirúrgicos, etc.) que, en ciertas situaciones lo hace una opción no viable para usarse como terapéutica (García-Gareta et al., 2015b). Por lo que existe la necesidad de encontrar sustitutos óseos que semejen las condiciones del estándar de oro (adecuada osteoinducción, osteoconducción, que no provoque reacciones de rechazo inmunológico o de infección) y que sea fácil de sintetizar.

Una de las características más importantes que estos materiales deben cumplir es la presencia de una adecuada porosidad, ya que esta favorece la migración y crecimiento celular, así como la formación de vasos sanguíneos; el tamaño de estos poros es crucial para un adecuado funcionamiento. En estudios previos se ha encontrado que tamaños de poros de $\sim 300 \mu\text{m}$ permiten una mayor osteogénesis al permitir una mayor permeabilidad y vascularización (Turnbull et al., 2018). Los poros de $\sim 100 \mu\text{m}$ son más favorables para la condrogénesis y los poros $\sim 10 \mu\text{m}$ mejoran las interacciones de las células con el andamio o injerto óseo. En este trabajo se obtuvieron diferentes tamaños de poro al emplear diferentes polímeros, particularmente la mezcla de esferas de PEMA y PMMA que nos permitió obtener porosidades de $\sim 250 \mu\text{m}$ hasta de menos de $20 \mu\text{m}$. Aparte del tamaño los poros, otro aspecto a considerar es la interconexión de estos, la cual es otro factor que permitirá un funcionamiento óptimo, en las diferentes imágenes 9, 10 11 y 12 se logra observar esta interconexión. Previamente se obtuvieron porosidades de ~ 1 hasta $40 \mu\text{m}$, donde se utilizó sólo PMMA como agente formador de poros, al agregar PEMA logramos obtener poros de mayor calibre que podrían mejorar el funcionamiento.

Diferentes moléculas han sido usadas para llevar a cabo la ingeniería de tejidos uniéndolas a andamios, de las más usadas se encuentran las BMP's debido a su papel en el desarrollo de huesos y cartílagos, así como su capacidad para fomentar la proliferación y diferenciación de células osteoprogenitoras, pero se enfrentan a la problemática de la formación ectópica de tejido óseo (Leblanc et al., 2011). En el caso de pHACD1/CAP,

no se ha encontrado la formación de tejido óseo ectópico, lo cual le otorga seguridad al usarlo como agente terapéutico, aunado a que previamente ha demostrado su capacidad y eficacia en la formación de cristales de HA en sistemas libres de células, regeneración de defectos óseos de tamaño crítico en calvarias de rata y tibias de conejo, así como defectos periodontales de molares de rata, además también ha demostrado su capacidad para funcionalizar superficies de titanio y fomentar la formación de cristales de HA sobre estas; todos estos antecedentes nos indican que es alternativa bastante atractiva para funcionalizar andamios de HA sintética para usarse como aloinjerto (Aguilar, 2022; Montoya, 2015; Salgado, 2017; Ureiro, 2020).

La relación Ca/P obtenida mediante EDS fue de 1.63 lo que indica que el material obtenido tiene la relación Ca/P de la HA. Existen otras fases de fosfatos de calcio con relación Ca/P diferentes (tabla 5).

Ca/P	Fórmula	Fase cristalina
1	CaHPO_4	Monetita (fosfato dicálcico)
1	$\text{CaHPO}_4\text{H}_2\text{O}$	Brushita (fosfato dicálcico dihidratado)
1.33	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_45\text{H}_2\text{O}$	Fosfato octacálcico
1.43	$\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_6$	Whitlockita
1.67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita

Tabla 5. Relación Ca/P de diferentes fosfatos de calcio.

Esto lo convierte en un material apto para utilizarse como ya que es una relación dentro del rango de la HA que se encuentra en el cuerpo humano.

En relación con el análisis de FTIR del péptido, se encuentran bandas atribuidas a grupos carboxilo y amina pertenecientes al péptido. También visualizamos grupos metilo (CH_3) y metileno (CH_2), los cuales podrían corresponder a cadenas laterales de los diferentes aminoácidos, como en la valina que presenta un CH_3 , la serina que posee un grupo CH_2 . Al combinar grenetina con el péptido, FTIR pep/gren, se puede observar el parecido de

este espectro con el de la HA junto con la grenetina, ya que ambas son moléculas con componentes peptídicos.

Otro punto por destacar en nuestro trabajo es la unión de pHACD1/CAP al andamio de HA. Dentro de los diferentes métodos de unión de moléculas a HA se encuentran la silanización, la adsorción y la reticulación por carbodiimida, en este trabajo se utilizó la adsorción. La interacción del péptido en la HA se analizó por espectroscopía FTIR. Uno de los trabajos donde se usó esta técnica para determinar la presencia de un péptido en partículas de HA/TCP-B (Acharya et al., 2012), encontramos espectros similares, debido a los materiales usados tienen una composición elemental muy parecida. En ambos espectros se muestran las bandas típicas de la HA con los OH alrededor de 3710 cm^{-1} y las diferentes bandas correspondientes a los grupos PO_4 , la zona de mayor interés para nosotros y ese estudio se da entre 1390 y 1881 cm^{-1} que se observa en ambos espectros nos indica que hay enlaces NH_2 , COO , C=O en el material lo que podemos atribuir a que el péptido está presente en el material.

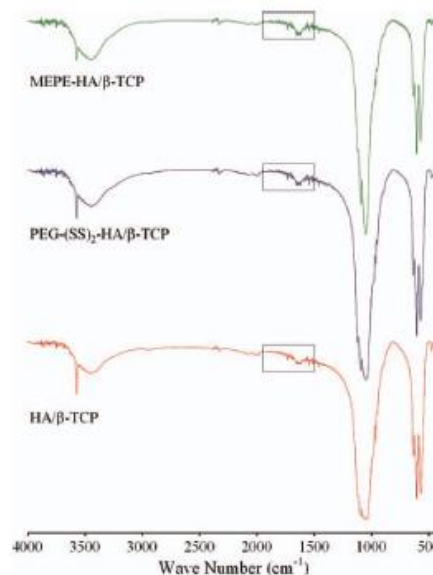
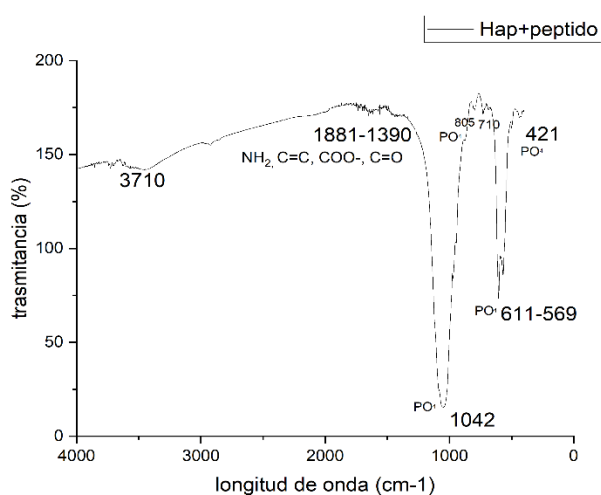


Imagen 30 Comparación del FTIR obtenido en este trabajo y el FTIR obtenido por Acharya et al., 2012

La limitante de esta técnica es que no permite cuantificar cuánto péptido de la solución se adsorbió en la superficie del material, sin embargo, sí podemos deducir que está presente en el material.

Los difractogramas obtenidos nos han demostrado que el agregar el pHACD1/CAP, parece no afectar la estructura de la HA, en estudios previos se demostraron los difractogramas correspondientes a las diferentes etapas del PGCM, donde tampoco se encontró un cambio importante en esta técnica (Alonso-Sierra Susana, 2013).. La aparición de una fase mineral diferente a la hidroxiapatita, en este caso la whitlockita se da como resultado del tratamiento térmico al cual fueron sometidas las muestras, sin embargo, esto no afecta la biocompatibilidad del biomaterial debido a que, la whitlockita es la segunda fase mineral con mayor presencia en el hueso nativo humano representando entre el 25-35% del contenido inorgánico(Jeong et al., 2019).

Se han realizado trabajos *in silico* para elucidar el papel de los aminoácidos en la interacción con superficies cerámicas como la HA; uno de estos trabajos estudió la adsorción BMP-7 en la superficie (001) de la HA, los extremos carboxilo (-COO) y amina (-NH₂) son los principales encargados de la adsorción formando interacciones electrostáticas el caso de los COO⁻ y los cationes Ca⁺⁺ de la superficie de la HA; y con puentes de hidrogeno formados entre de NH₂/NH₃ y los fosfatos de la HA (Zhou et al., 2007). Nuestros resultados de docking molecular muestran que la interacción puede estar mediada por los residuos de serina presentes en la secuencia del pHACA1/CAP. Además de trabajos que estudian el comportamiento de la interacción de proteínas completas, se han realizado estudios utilizando péptidos derivados de proteínas relacionadas con la regeneración ósea, donde se estudiaron péptidos derivados de BMP-7 KQLNALSVLVYFDD de 13 aminoácidos y su interacción sobre modelos de HA diseñada con superficies cóncavas y convexas, particularmente la superficie (110), en este caso encontraron que el ácido aspártico(ASP) y la asparagina(ASN) tuvieron interacción sobre superficies cóncavas entre los calcio de HA y oxígenos de ASP y ASN. El OH de las lisinas interactuaron con los átomos de O que se encuentran en los grupos PO₄ de la HA (Wang et al., 2017).

10. Conclusiones

La finalidad de añadir moléculas osteoinductoras a injertos aloplásticos es compensar su falta de osteoinducción, el primer paso para ello es la caracterización de estos biomateriales, este trabajo nos permitió comenzar una nueva línea de investigación que en un futuro podría ser una opción más para los tratamientos de regeneración ósea.

Los resultados presentados en este estudio nos permiten concluir que obtuvimos un material con adecuadas características químicas y morfológicas (al obtener una adecuada porosidad y forma deseada), La porosidad jerárquica obtenida por la combinación de PEMA y PMMA, podría mejorar la relación entre andamio y el tejido huésped que, beneficiará al funcionamiento de este tipo de implantes óseos.

También, se demostró que el pHACD1/CAP tiene afinidad por la HA, pese a su naturaleza principalmente apolar esto le permite interactuar con la superficie de los andamios con el fin de lograr la funcionalización de estos.

El estudio de docking molecular permitió dar una explicación a cómo se podría dar la interacción entre el biomaterial y una biomolécula, lo que demuestra que este tipo de modelos son una gran alternativa para dar una explicación teórica de las interacciones entre estos.

11. Perspectivas

Una vez determinado que el péptido tiene afinidad por la superficie de la HA, se debe indagar más el efecto sinérgico que podrían tener en el proceso de mineralización. Se podría empezar por realizarse estudios de diferenciación y viabilidad celular sobre el material, así como un modelo de defecto óseo de tamaño crítico en alguna especie para indagar el potencial del material compuesto en la regeneración ósea. También podrían realizarse estudios para medir las propiedades físico-mecánicas del material

Otro aspecto para considerar en el futuro es el realizar más estudios *in silico* de los péptidos derivados de HACD1/CAP y cristales de HA para poder obtener más información de cómo podrían realizar su interacción bajo

condiciones fisiológicas y con las diferentes superficies de los cristales de HA, lo cual podría hacerse utilizando dinámica molecular.

12. Bibliografía

- Acharya, B., Chun, S. Y., Kim, S. Y., Moon, C., Shin, H. I., & Park, E. K. (2012). Surface immobilization of MEPE peptide onto HA/ β -TCP ceramic particles enhances bone regeneration and remodeling. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 100 B(3), 841–849. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32648>
- Aguilar, V. (2022). Regeneración del defecto periodontal in vivo, inducido a través de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAPp-15). Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://132.248.9.195/ptd2021/diciembre/0820657/Index.html>
- Alonso-Sierra, S., Velázquez-Castillo, R., Millán-Malo, B., Nava, R., Bucio, L., Manzano-Ramírez, A., Cid-Luna, H., & Rivera-Muñoz, E. M. (2017). Interconnected porosity analysis by 3D X-ray microtomography and mechanical behavior of biomimetic organic-inorganic composite materials. *Materials Science and Engineering C*, 80, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.106>
- Alonso-Sierra Susana. (2013). Control de la macroporosidad de un material compuesto orgánico-inorgánico a base de hidroxiapatita: síntesis y caracterización. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Campus Juriquilla. <http://132.248.9.195/ptd2013/agosto/0698452/Index.html>
- Alvarez-Pérez, M. A., Narayanan, S., Zeichner-David, M., Rodríguez Carmona, B., & Arzate, H. (2006). Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone*, 38(3), 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.09.009>
- Arzate, H., Olson, S. W., Page, R. C., Gown, A. M., & Narayanan, A. S. (1992). Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *The FASEB Journal*, 6(11), 2990–2995. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.11.1644261>
- Barkana, I., Narayanan, A. S., Grosskop, A., Savion, N., & Pitaru, S. (2000). Cementum attachment protein enriches putative cementoblastic populations on

root surfaces in vitro. *Journal of Dental Research*, 79(7), 1482–1488.
<https://doi.org/10.1177/00220345000790070901>

Bermúdez, M., Hoz, L., Montoya, G., Nidome, M., Pérez-Soria, A., Romo, E., Soto-Barreras, U., Garnica-Palazuelos, J., Aguilar-Medina, M., Ramos-Payán, R., & Villegas-Mercado, C. (2021). Bioactive Synthetic Peptides for Oral Tissues Regeneration. *Frontiers in Materials*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fmats.2021.655495>

Bhat, S., & Kumar, A. (2013a). Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter*, 3(3). <https://doi.org/10.4161/biom.24717>

Blondelle, J., Ohno, Y., Gache, V., Guyot, S., Storck, S., Blanchard-Gutton, N., Barthélémy, I., Walmsley, G., Rahier, A., Gadin, S., Maurer, M., Guillaud, L., Prola, A., Ferry, A., Aubin-Houzelstein, G., Demarquoy, J., Relaix, F., Piercy, R. J., Blot, S., ... Pilot-Storck, F. (2015). HACD1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *Journal of Molecular Cell Biology*, 7(5), 429–440.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv049>

Boyan, B. D., Batzer, R., Kieswetter, K., Liu, Y., Cochran, D. L., Szmuckler-Moncler, S., Dean, D. D., & Schwartz, Z. (1998). Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$. *Journal of Biomedical Materials Research*, 39(1). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199801\)39:1<77::AID-JBM10>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199801)39:1<77::AID-JBM10>3.0.CO;2-L)

Breeland, G., Sinkler, M. A., & Menezes, R. G. (2021). Embryology, Bone Ossification.

Bullock, G., Atkinson, J., Gentile, P., Hatton, P., & Miller, C. (2021c). Osteogenic Peptides and Attachment Methods Determine Tissue Regeneration in Modified Bone Graft Substitutes. *Journal of Functional Biomaterials*, 12(2).
<https://doi.org/10.3390/jfb12020022>

Caeiro, J. R., González, P., & Guede, D. (2013). Biomecánica y hueso: ensayos en los distintos niveles jerárquicos del hueso y técnicas alternativas para la determinación de la resistencia ósea. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 5(2), 99–108. <https://doi.org/10.4321/S1889-836X2013000200007>

- Campa, J., Rivera-Muñoz, E. (2007). *Biomateriales. Fundamentos, técnicas y aplicaciones*. Editorial Universidad de Guadalajara.
- Chan, O., Coathup, M. J., Nesbitt, A., Ho, C. Y., Hing, K. A., Buckland, T., Champion, C., & Blunn, G. W. (2012). The effects of microporosity on osteoinduction of calcium phosphate bone graft substitute biomaterials. *Acta Biomaterialia*, 8(7), 2788–2794. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.038>
- Chavda, S., & Levin, L. (2018). Human Studies of Vertical and Horizontal Alveolar Ridge Augmentation Comparing Different Types of Bone Graft Materials: A Systematic Review. *Journal of Oral Implantology*, 44(1), 74–84. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-17-00053>
- Eliaz, N., & Metoki, N. (2017). Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/ma10040334>
- Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I., Angel Alobera Gracia, M., del Canto Pingarrón, M., Blanco Jerez, L., Carlos, J., & Titular, P. (2005). E47 Cirugía Bucal Histología y fisiología del tejido óseo Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 11(1), 47-51. Recuperado en 09 de agosto de 2022, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169869462006000100011&lng=es&tlng=es. Fortoul, T. (2017). *Histología y biología celular*. (Tercera Edición). Mc. Graw Hill.
- García-Gareta, E., Coathup, M. J., & Blunn, G. W. (2015a). Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*, 81, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.07.007>
- Ghassemi, T., Shahroodi, A., Ebrahimzadeh, M. H., Mousavian, A., Movaffagh, J., & Moradi, A. (2018). Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *The Archives of Bone and Joint Surgery*, 6(2), 90–99.
- Guillen-Romero, L. D., Oropeza-Guzmán, M. T., López-Maldonado, E. A., Iglesias, A. L., Paz-González, J. A., Ng, T., Serena-Gómez, E., & Villarreal-Gómez, L. J. (2019). Synthetic hydroxyapatite and its use in bioactive coatings. *Journal of*

Applied Biomaterials & Functional Materials, 17(1), 228080001881746.
<https://doi.org/10.1177/2280800018817463>

Hernández, S. (2016). Péptido derivado de CAP para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo animal. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México <http://132.248.9.195/ptd2016/agosto/0748247/Index.html>

Jeong, J., Kim, J. H., Shim, J. H., Hwang, N. S., & Heo, C. Y. (2019). Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomaterials Research*, 23(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0149-3>

Keating, J. F., Simpson, A. H. R. W., & Robinson, C. M. (2005). The management of fractures with bone loss. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 87-B(2). <https://doi.org/10.1302/0301-620X.87B2.15874>

Leblanc, E., Trensztz, F., Haroun, S., Drouin, G., Bergeron, É., Penton, C. M., Montanaro, F., Roux, S., Faucheux, N., & Grenier, G. (2011). BMP-9-induced muscle heterotopic ossification requires changes to the skeletal muscle microenvironment. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(6), 1166–1177. <https://doi.org/10.1002/jbmr.311>

Liu, H. W., Yacobi, R., Savion, N., Narayanan, A. S., & Pitaru, S. (1997). A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(10), 1691–1699. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.10.1691>

Ma, P. X. (2008). Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(2). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.041>

María Elsa Gómez de Ferraris, & Antonio Campos Muñoz. (2009). *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental* (3rd ed.). Editorial Médica Panamericana.

Martínez Álvarez, O., Barone, A., Covani, U., Fernández Ruíz, A., Jiménez Guerra, A., Monsalve Guil, L., & Velasco Ortega, E. (2018). Bone grafts and bone substitutes in implant dentistry. *Avances En Odontoestomatología*, 34(3), 111–119.

Montoya, G. (2015). Estudio de cristales inducidos con el péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) en un sistema libre de células. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

<http://132.248.9.195/ptd2015/abril/0728558/Index.html>

Montoya, G., Arenas, J., Romo, E., Zeichner-David, M., Alvarez, M., Narayanan, A. S., Velázquez, U., Mercado, G., & Arzate, H. (2014). Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. *Bone*, 69, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.09.014>

Nidome, M. (2018). Estudio de plegamiento y estabilidad estructural de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1CAP). Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

<http://132.248.9.195/ptd2018/junio/0775125/Index.html>

Ripamonti, U. (1996). Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*, 17(1), 31–35. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)80752-6](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)80752-6)

Rivera-Muñoz, E. M., Rogelio, J., Talavera, R., Brostow, W., Rivera-Mun, E., Oz, Ä., di Ä Az, J. R., Rodri, J. R., Guez, Ä., Brostow, W., & Castan Ä O, V. M. (2001). Hydroxyapatite spheres with controlled porosity for eye ball prosthesis: Processing and characterization Influence of pollution in geotechnical properties of expansive soils View project Optical properties of natural products View project Hydroxyapatite spheres with controlled porosity for eye ball prosthesis: processing and characterization. <https://www.researchgate.net/publication/8365671>

Rivera-Muñoz, E., Velázquez, R., & Rodríguez, R. (2003). Improvement in mechanical properties of hydroxyapatite objects with controlled porosity made by modified gelcasting process. *Materials Science Forum*, 426–432(5), 4489–4494. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/msf.426-432.4489>

Roldán Vasco, S., Vargas Isaza, C. A., Mejía Suaza, M. L., Zapata Giraldo, J., & Moncada Acevedo, M. E. (2016). Ingeniería de tejidos y aplicaciones. Instituto Tecnológico Metropolitano. <https://doi.org/10.22430/9789588743844>

Sáenz, A., Rivera-Muñoz, E., Brostow, W., & Castaño, V. M. (1999). Ceramic biomaterial an introductory overview. In *Journal of Materials Education* (Vol. 21, Issue 6). <http://www.unt.edu/LAPOM/>

Saito, M., Iwase, M., Maslan, S., Nozaki, N., Yamauchi, M., Handa, K., Takahashi, O., Sato, S., Kawase, T., Teranaka, T., & Narayanan, A. S. (2001). Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone*, 29(3), 242–248. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00573-7](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00573-7)

Salgado, F. (2014). Inducción de la regeneración ósea en defectos óseos severos por el efecto del péptido novel derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP). Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

<http://132.248.9.195/ptd2014/agosto/0716649/Index.html>

Salgado, F. (2017). Desarrollo de la fase preclínica de fármacos peptídicos derivados de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) y su potencial eficacia en el tratamiento de la osteoporosis. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

<http://132.248.9.195/ptd2017/septiembre/0764658/Index.html>

Salinas, A. J., & Vallet-Regí, M. (2008). The Sol–Gel Production of Bioceramics. *Key Engineering Materials*, 391. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.391.141>

Sanders, D. W., Bhandari, M., Guyatt, G., Heels-Ansdell, D., Schemitsch, E. H., Swiontkowski, M., Tornetta, P., & Walter, S. (2014). Critical-Sized Defect in the Tibia. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 28(11). <https://doi.org/10.1097/BOT.000000000000194>

Szcześ, A., Hołysz, L., & Chibowski, E. (2017). Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.007>

Tortora James, & Derrickson Bryan. (2018). *Principios de anatomía y fisiología* (15th ed.). Editorial Médica Panamericana.

- Trujillo, D. M., Isabel, I. D., Brito, M., René, I. I., Sarduy, R., Jorge, I. J., Rodríguez, P., Dra, I. I. I., Aurora, E., & Mír, P. (2014). Injertos óseos en implantología oral. *Revista Médica Electrónica*, 36(4), 449–461.
- Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F., Li, B., & Shu, W. (2018). 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. In *Bioactive Materials* (Vol. 3, Issue 3, pp. 278–314). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>
- Ureiro, G. (2020). Papel de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) en la funcionalización de superficies de titanio y óxido de titanio. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://132.248.9.195/ptd2020/agosto/0802854/Index.html>
- Uwanogho, D. A., Hardcastle, Z., Balogh, P., Mirza, G., Thornburg, K. L., Ragoussis, J., & Sharpe, R. T. (1999). Molecular cloning, chromosomal mapping, and developmental expression of a novel protein tyrosine phosphatase-like gene. *Genomics*, 62(3), 406–416. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5950>
- Valdés De Hoyos, A., Hoz-Rodríguez, L., Arzate, H., & Narayanan, A. S. (2012). Isolation of protein-tyrosine phosphatase-like member-a variant from cementum. *Journal of Dental Research*, 91(2), 203–209. <https://doi.org/10.1177/0022034511428155>
- Vallet-Regí, M., Ruiz-Hernández, E., Vallet-Regí, M., & Ruiz-Hernández, E. (2011). Bioceramics: From Bone Regeneration to Cancer Nanomedicine. *Adv. Mater*, 23, 5177–5218. <https://doi.org/10.1002/adma.201101586>
- Wang, Q., Wang, M., Lu, X., Wang, K., Fang, L., Ren, F., & Lu, G. (2017). Effects of atomic-level nano-structured hydroxyapatite on adsorption of bone morphogenetic protein-7 and its derived peptide by computer simulation. *Scientific Reports*, 7(1), 15152. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15219-6>
- Williams, D. F. (2009). Leading Opinion On the nature of biomaterials q. *Biomaterials*, 30, 5897–5909. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027>

Zhou, H., Wu, T., Dong, X., Wang, Q., & Shen, J. (2007). Adsorption mechanism of BMP-7 on hydroxyapatite (001) surfaces. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(1), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.169>