



# FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

FORMACIÓN DE CRISTALES DE HIDROXIAPATITA MEDIANTE EL USO DE L-AMINOÁCIDOS.

TESIS

# QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

PRESENTA:

# KAREN AIDE MARTÍNEZ BOLAÑOS

TUTOR: Dr. ENRIQUE ROMO ARÉVALO

MÉXICO, Cd. Mx.



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

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

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

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

#### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Romo, por su paciencia y dedicación tanto en el proyecto como en mi formación. Su compromiso y enseñanzas fueron fundamentales para mi desarrollo y éxito en este proyecto.

Al Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología UNAM por todas las facilidades de insumo, herramientas y espacio para la elaboración de este trabajo de investigación.

A la Mtra. Laura Gómez del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por su gentileza y ayuda para la adquisición de imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM).

Al Químico Iván Puente Lee, de la Facultad de Química UNAM USAII por su apoyo en la obtención de análisis EDS.

Al Químico Israel Cortes, por su crucial ayuda en la obtención e interpretación de los análisis FT/IR.

Al Dr. Samuel Jiménez, por permitirme y brindarme su apoyo incondicional para la elaboración de este proyecto.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT UNAM) **Proyecto IN202024**.

# DEDICATORIAS

A mí madre, por su apoyo y amor que siempre me brindo para seguir y conseguir un mejor futuro para mí, a su vez, ser una inspiración en todo, lo cual agradezco y admiro.

A mi hermana Nataly y mis sobrinas Dulce y Sofia, les agradezco por su apoyo y comprensión en este trayecto. Sin ustedes, no sé dónde estaría. Gracias por todo lo que han hecho por mí. Las quiero demasiado.

A mis abuelos Macrina Petra y José Martínez, gracias por su amor y apoyo que siempre mostraron hacia mí.

A Gus, Freya, Perla, Luna y Junior, por estar siempre a mí lado con su amor incondicional. Su aprecio y su compañía siempre han hecho más llevaderos los momentos difíciles.

A todas mis amistades que siempre han estado mí lado, incluso en mi ausencia. Gracias por todo su apoyo y motivarme a mejorar y seguir: Carolina, Ana, Diego, Jesus, Mich, Eduardo, Tris, Neri, Brian y Melanie, les doy las gracias de todo corazón por estar siempre presentes en mi vida. Los quiero y aprecio mucho.

# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	. 1
RESUMEN	. 2
ABSTRACT	. 3
ANTECEDENTES	. 4
Osteopontina (OPN)	4
Sialoproteína ósea II (BSP II )	.5
Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular (MEPE)	.5
Proteína 1 de la matriz dentinaria (DMP-1)	.6
Proteína del cemento 1 (CEMP 1)	6
Osteonectina(ON)	.7
Amelogenina	.7
Fosfatasa alcalina (ALP)	.7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	. 8
JUSTIFICACIÓN	. 8
HIPÓTESIS	. 9
OBJETIVOS	. 9
METODOLOGÍA	10
Conformación del sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato.	10
Conformación del gel de silicato	10
Recolección de cristales	11
Microscopia electrónica de barrido (SEM)	12
Espectroscopia infrarroja por transformada en Fourier (FT/IR)	12
Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS)	12
RESULTADOS	13
Elaboración del gel de silicato	13

Visualización directa de los cristales dentro del sistema de con mediante el uso de microscopio estereoscópico	tradifusión 15
Caracterización tridimensional mediante el uso de SEM	19
Análisis de composición química FT/IR	47
Análisis del porcentaje de la fase mineral mediante EDS	75
DISCUSIÓN	103
PERSPECTIVAS	109
CONCLUSIÓN	1100
REFERENCIAS	111

# LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Microgramo
μm	Micrómetro
ÂA	Aminoácidos
ALP	Fosfatasa alcalina
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
BD	Beam Diameter
BSP II	Sialoproteína ósea II
Са	Calcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
Ca/P	Calcio / Fósforo
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Fosfato de calcio
CEMP-1	Proteína del cemento 1
DMP-1	Proteína de la matriz dentinaria
cm	Centímetros
EDS	Espectroscopia de Dispersión de Energía
Phe	Fenilalanina
FT/IR	Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier
Glu	Ácido glutámico
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
gr/ mL	Gramo / mililitro
HA	Hidroxiapatita
HEPES	Ácido (4-(2-Hidroxietil)piperazina-N-etanolsulfónico))
His	Histidina
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI	Ácido fosfórico High Quality Infrared
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM	Ácido fosfórico High Quality Infrared Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID	Ácido fosfórico High Quality Infrared Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución Internal Diameter
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa	Ácido fosfórico High Quality Infrared Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución Internal Diameter Kilodalton
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa M	Ácido fosfórico High Quality Infrared Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución Internal Diameter Kilodalton molar
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa M MEPE	Ácido fosfórico High Quality Infrared Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución Internal Diameter Kilodalton molar Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa M MEPE mg/mL	Ácido fosfórico     High Quality Infrared     Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución     Internal Diameter     Kilodalton     molar     Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular     Miligramo por mililitro
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa M MEPE mg/mL mM	Ácido fosfórico High Quality Infrared Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución Internal Diameter Kilodalton molar Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular Miligramo por mililitro Milimolar
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa M MEPE mg/mL mM NaCI	Ácido fosfórico High Quality Infrared Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución Internal Diameter Kilodalton molar Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular Miligramo por mililitro Milimolar Cloruro de calcio
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa M MEPE mg/mL mM NaCl NaOH	Ácido fosfórico High Quality Infrared Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución Internal Diameter Kilodalton molar Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular Miligramo por mililitro Milimolar Cloruro de calcio Hidróxido de sodio
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa M MEPE mg/mL mM NaCl NaOH Na2SiO <sub>3</sub>	Ácido fosfórico High Quality Infrared Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución Internal Diameter Kilodalton molar Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular Miligramo por mililitro Milimolar Cloruro de calcio Hidróxido de sodio Silicato de sodio
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa M MEPE mg/mL mM NaCI NaOH Na2SiO <sub>3</sub> OPN	Ácido fosfórico High Quality Infrared Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución Internal Diameter Kilodalton molar Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular Miligramo por mililitro Milimolar Cloruro de calcio Hidróxido de sodio Silicato de sodio Osteopontina
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa M MEPE mg/mL mM NaCI NaOH Na2SiO <sub>3</sub> OPN P	Ácido fosfórico High Quality Infrared Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución Internal Diameter Kilodalton molar Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular Miligramo por mililitro Milimolar Cloruro de calcio Hidróxido de sodio Silicato de sodio Osteopontina Fósforo
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa M MEPE mg/mL mM NaCl NaOH Na2SiO <sub>3</sub> OPN P P PH	Ácido fosfórico High Quality Infrared Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución Internal Diameter Kilodalton molar Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular Miligramo por mililitro Milimolar Cloruro de calcio Hidróxido de sodio Silicato de sodio Osteopontina Fósforo Potencial de Hidrógeno
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa M MEPE mg/mL mM NaCl NaOH Na2SiO <sub>3</sub> OPN P P PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico         High Quality Infrared         Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución         Internal Diameter         Kilodalton         molar         Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular         Miligramo por mililitro         Milimolar         Cloruro de calcio         Hidróxido de sodio         Silicato de sodio         Osteopontina         Fósforo         Potencial de Hidrógeno         Fosfato
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa M MEPE mg/mL mM NaCl NaOH Na2SiO <sub>3</sub> OPN P P PH PO <sub>4</sub> PNC	Ácido fosfórico         High Quality Infrared         Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución         Internal Diameter         Kilodalton         molar         Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular         Miligramo por mililitro         Milimolar         Cloruro de calcio         Hidróxido de sodio         Silicato de sodio         Osteopontina         Fósforo         Potencial de Hidrógeno         Fosfato         Proteínas no colágenas
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI HRTEM ID kDa M MEPE mg/mL mM NaCl NaOH Na2SiO <sub>3</sub> OPN P P PH PO <sub>4</sub> PNC Pro	Ácido fosfórico         High Quality Infrared         Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución         Internal Diameter         Kilodalton         molar         Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular         Miligramo por mililitro         Miligramo por mililitro         Miligramo por mililitro         Silicato de calcio         Hidróxido de sodio         Silicato de sodio         Osteopontina         Fósforo         Potencial de Hidrógeno         Fosfato         Proteínas no colágenas         Prolina
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI         HRTEM         ID         kDa         M         MEPE         mg/mL         mM         NaCI         NaOH         Na2SiO <sub>3</sub> OPN         P         pH         PO <sub>4</sub> PNC         Pro         RGD         OPN	Ácido fosfórico         High Quality Infrared         Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución         Internal Diameter         Kilodalton         molar         Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular         Miligramo por mililitro         Milimolar         Cloruro de calcio         Hidróxido de sodio         Silicato de sodio         Osteopontina         Fósforo         Potencial de Hidrógeno         Fosfato         Proteínas no colágenas         Prolina         Arginina- Glicina- Ácido aspártico
$\begin{array}{c} H_{3}PO_{4} \\ HQI \\ HRTEM \\ ID \\ kDa \\ M \\ MEPE \\ mg/mL \\ mM \\ NaCl \\ NaOH \\ Na2SiO_{3} \\ OPN \\ P \\ PH \\ PO_{4} \\ PNC \\ Pro \\ RGD \\ SEM \\ O \\ P \\ \end{array}$	Ácido fosfórico         High Quality Infrared         Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución         Internal Diameter         Kilodalton         molar         Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular         Miligramo por mililitro         Milimolar         Cloruro de calcio         Hidróxido de sodio         Silicato de sodio         Osteopontina         Fósforo         Potencial de Hidrógeno         Fosfato         Proteínas no colágenas         Prolina         Arginina- Glicina- Ácido aspártico         Microscopia electrónica de barrido
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI         HRTEM         ID         kDa         M         MEPE         mg/mL         mM         NaCl         NaOH         Na2SiO3         OPN         P         pH         PO4         PNC         Pro         RGD         SEM         Ser	Ácido fosfórico         High Quality Infrared         Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución         Internal Diameter         Kilodalton         molar         Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular         Miligramo por mililitro         Milimolar         Cloruro de calcio         Hidróxido de sodio         Silicato de sodio         Osteopontina         Fósforo         Potencial de Hidrógeno         Fosfato         Proteínas no colágenas         Prolina         Arginina- Glicina- Ácido aspártico         Microscopia electrónica de barrido         Serina
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI         HRTEM         ID         kDa         M         MEPE         mg/mL         mM         NaCl         NaOH         Na2SiO3         OPN         P         pH         PO <sub>4</sub> Pro         RGD         SEM         Ser         SIBLING	Ácido fosfórico         High Quality Infrared         Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución         Internal Diameter         Kilodalton         molar         Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular         Miligramo por mililitro         Milimolar         Cloruro de calcio         Hidróxido de sodio         Silicato de sodio         Osteopontina         Fósforo         Potencial de Hidrógeno         Fosfato         Proteínas no colágenas         Prolina         Arginina- Glicina- Ácido aspártico         Microscopia electrónica de barrido         Serina         Small Integrin-Binding Ligand, N-linked glycoprotein
$\begin{array}{c} H_{3}PO_{4} \\ HQI \\ HRTEM \\ ID \\ kDa \\ M \\ MEPE \\ mg/mL \\ mM \\ NaCl \\ NaOH \\ Na2SiO_{3} \\ OPN \\ P \\ PH \\ PO_{4} \\ PNC \\ PR \\ PO_{4} \\ PNC \\ Pro \\ RGD \\ SEM \\ Ser \\ SIBLING \\ Thr \\ - \end{array}$	Ácido fosfórico         High Quality Infrared         Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución         Internal Diameter         Kilodalton         molar         Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular         Miligramo por mililitro         Milimolar         Cloruro de calcio         Hidróxido de sodio         Silicato de sodio         Osteopontina         Fósforo         Potencial de Hidrógeno         Fosfato         Proteínas no colágenas         Prolina         Arginina- Glicina- Ácido aspártico         Microscopia electrónica de barrido         Serina         Small Integrin-Binding Ligand, N-linked glycoprotein         Treonina
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> HQI         HRTEM         ID         kDa         M         MEPE         mg/mL         mM         NaCl         NaOH         Na2SiO3         OPN         P         pH         PO4         PNC         Pro         RGD         SEM         Ser         SIBLING         Thr         Tyr         VAP	Ácido fosfórico         High Quality Infrared         Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución         Internal Diameter         Kilodalton         molar         Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular         Miligramo por mililitro         Milimolar         Cloruro de calcio         Hidróxido de sodio         Silicato de sodio         Osteopontina         Fósforo         Potencial de Hidrógeno         Fosfato         Proteínas no colágenas         Prolina         Arginina- Glicina- Ácido aspártico         Microscopia electrónica de barrido         Serina         Small Integrin-Binding Ligand, N-linked glycoprotein         Treonina         Tirosina

# RESUMEN

La biomineralización es el proceso mediante el cual los seres vivos crean estructuras mineralizadas. Este proceso implica la participación de dos grupos de proteínas: la colágena, que actúa como andamio estructural, y ciertas proteínas no colágenas (PNC) asociadas al proceso de biomineralización, que están relacionadas con la atracción, organización y depósito de iones de calcio (Ca) y fósforo (P) dentro de la matriz orgánica.

Las PNC comparten características vinculadas al proceso de biomineralización, las cuales son caracterizadas por un bajo contenido de estructura secundaria y por presentar regiones enriquecidas en aminoácidos (AA) tales como ácido glutámico (Glu), ácido aspártico (Asp), arginina (Arg), lisina (Lys), serina (Ser), histidina (His) treonina (Thr), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe). Estas características les confieren la propiedad de atraer y organizar iones Ca y P para la posterior nucleación interfibrilar de hidroxiapatita (HA) y sus precursores en sistemas biológicos.

El objetivo de este trabajo fue determinar si ciertos AA, solos o en combinación, tienen el potencial de formar cristales de HA en el sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato.

La metodología consistió en utilizar Glu, Asp, His, Arg, Ser y Phe en concentraciones de 100 µg, 200 µg y 500 µg en el sistema contradifusión en gel de silicato. Las pruebas se mantuvieron durante 7 días en incubación y posteriormente se recuperaron los cristales para su análisis de estructura por microscopia electrónica de barrido (SEM) y análisis de composición química por espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FT/IR) y análisis de energía dispersiva de rayos X (EDS).

Nuestros resultados demuestran que ciertos aminoácidos tienen la capacidad de formar cristales de HA con estructuras minerales tipo drusa con disposición radial, similares a los que forman proteínas asociadas a la biomineralización.

La información obtenida en este estudio es de gran relevancia, ya que podría ser fundamental para el desarrollo de futuras terapias dirigidas a promover la formación de tejidos mineralizados, sin depender de proteínas o péptidos durante este proceso.

# ABSTRACT

Biomineralization is the process by which living beings create mineralized structures. This process involves the participation of two groups of proteins: collagen, which acts as a structural scaffold, and certain non-collagenous proteins (PNC) associated with the biomineralization process, which are related to the attraction, organization, and deposition of calcium (Ca) and phosphorus (P) ions within the organic matrix.

Non collagenous proteins share characteristic associated to the mineralization process: low content of secondary structure and have regions enriched in amino acids (AA) such as glutamic acid (Glu), aspartic acid (Asp), arginine (Arg), lysine (Lys), serine (Ser), threonine (Thr), tyrosine (Try) and phenylalanine (Phe). These characteristics confer them the property of attracting and organizing Ca and P ions for the subsequent interfibrillar nucleation of hydroxyapatite (HA) and its precursors in biological systems.

The objective of this work was to determine whether certain AA, alone or in combination, have the potential to form HA crystals in the cell-free counterdiffusion silicate gel system.

Our methodology consisted of using Glu, Asp, His, Arg, Ser and Phe at concentrations of 100 µg, 200 µg and 500 µg in and incorporated them in the cell-free counter-diffusion silicate gel system. The tests were kept for 7 days in incubation and the crystals were subsequently recovered for structure analysis by scanning electron microscopy (SEM) and chemical composition analysis by Fourier transform infrared spectroscopy (FT/IR) and energy dispersive X- ray analysis (EDS)

Our results demonstrate that certain amino acids have the ability to form HA crystals with druse-like mineral structures and radial arrangement, similar to those formed by proteins associated with the biomineralization process.

The information obtained in this study is of great relevance, as it could be fundamental for the development of future therapies aimed at promoting the formation of mineralized tissues, without relying on proteins or peptides.

# ANTECEDENTES

La biomineralización es un proceso biológico dinámico y constante que implica en la deposición precisa de cristales minerales de apatita dentro de una matriz orgánica, lo que contribuye a la formación de tejidos mineralizados en organismos vivos. (1,2)

Los tejidos mineralizados se encuentran constituidos por dos componentes principales: una matriz orgánica y una matriz inorgánica, ambas participan activamente en el proceso de mineralización (3). La matriz inorgánica, está constituida principalmente por cristales de HA (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>), que confiere propiedades de resistencia y rigidez mecánica a los tejidos mineralizados, además, facilita el intercambio mineral de Ca y P. (4,5)

La matriz orgánica tiene como componente principal colágena tipo I el cual sirve como andamio activo para la conformación de placas de HA orientada con dominios cargados de AA tanto en la zona de separación como en la zona de superposición que actúan como sitios de nucleación para los cristales de HA, así como la participación de proteoglicanos y PNC asociadas al proceso de mineralización. (6,7,8)

Las PNC desempeñan un papel fundamental en la nucleación y formación precisa de los cristales de HA, además actúan como reguladores en la unión a colágena, y, por tanto, son cruciales en el proceso de mineralización. (9,10,11). Algunas de las principales PNC participantes durante este proceso son:

# **Osteopontina (OPN)**

La osteopontina (OPN) es una proteína presente en una gran variedad de tejidos, tanto blandos como mineralizados, que incluyen músculo, dentina y hueso. La OPN pertenece al grupo de proteínas SIBLING (Small Integrin-Binding Lingand N-linked Glycoproteins), y su gen se encuentra en el cromosoma 4 humano. Se compone de 314 AA, con un peso molecular teórico de aproximadamente 35,423 kilodalton (kDa). Presenta una estructura intrínsecamente desordenada, confiriéndole la propiedad de flexibilidad. Exhibe secuencias de Asp y sitios de fosforilación de Ser/Thr, responsables en la unión y formación de cristales de HA en tejidos mineralizados. En un contexto óseo, OPN es el componente principal

en la diferenciación y atracción de osteoclastos, además de regular el crecimiento y desarrollo de la HA en la matriz extracelular. Específicamente en tejidos mineralizados, OPN actúa como un regulador en la adhesión celular, la modulación de la actividad osteoclástica y regularización en la matriz extracelular. (10,12,13,14)

#### Sialoproteína ósea II (BSP II)

La sialoproteína ósea II (BSP II) es una proteína presente en el tejido óseo, cemento radicular y dentina. Es miembro de la familia SIBLING y su gen se localiza en el cromosoma 4 humano. Tiene un peso molecular de aproximadamente 35,148 kDa y está compuesta por 317 AA, además, presenta una estructura intrínsicamente desordenada que le otorga variabilidad en su plegamiento. Esta proteína presenta tres regiones de Glu (carga negativa), que actúan como andamio en la iniciación y promoción en la nucleación y formación de cristales de HA. Además de estas propiedades, la BSP cuenta con diversos dominios funcionales: un dominio de unión a colágena en el extremo N-terminal y un dominio de unión a la metaloproteinasa de matriz. También cuenta con un dominio de unión a la integrina en el extremo C-terminal, la cual facilita la señalización, unión y la migración celular debido a las secuencias de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) que posee. (10,14,15,16)

#### Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular (MEPE)

La fosfoglicoproteína de la matriz extracelular (MEPE) es una proteína presente en tejidos mineralizados, como tejido óseo y dentinario. Pertenece a la familia SIBLING y tiene su origen en el cromosoma 4 humano. Su masa molecular es de aproximadamente 58,419 kDa y está compuesta a su vez por 525 AA. MEPE presenta una estructura intrínsicamente desordenada lo que le confiere flexibilidad en su plegamiento. Contiene principalmente secuencias de AA ricos en Ser y Asp. MEPE se encuentra asociada con los péptidos ASARM, y en conjunto actúan como un modulador en la regularización de la mineralización, además, inhibe la incorporación de fosfato y la formación de HA durante el proceso de biomineralización. (10,14,17,18,19,20).

#### Proteína 1 de la matriz dentinaria (DMP-1)

La proteína 1 de la matriz dentinaria (DMP-1) es una proteína que actúa en el proceso de mineralización y diferenciación de tejidos mineralizados, tanto en tejido óseo como dentinario, y pertenece a la familia SIBLING. Su gen se localiza en el cromosoma 4, y cuenta con una masa molecular de aproximadamente 55.782 kDa, conformado por 513 AA. Estructuralmente, está conformado por secuencias de AA enriquecidas en Ser, Glu y Asp. Además de su función como regulador transcripcional en la diferenciación terminal de osteoblastos y odontoblastos, DMP-1 ejerce como un sitio de nucleación para la HA en la matriz extracelular, la cual interactúa con las fibrillas de colágena autoensambladas, y actúa como una proteína reguladora en la matriz extracelular del tejido óseo y dentinario. Finalmente, se ha observado que DMP-1 se une específicamente a la colágena I, lo que contribuye a su capacidad para influir en la nucleación y el crecimiento de estos tejidos mineralizados. (10,14,21,22)

#### Proteína del cemento 1 (CEMP-1)

La proteína del cemento 1 (CEMP-1), se expresa en el cemento radicular dental y ligamento periodontal. Su gen se localiza en el cromosoma 16, tiene una masa molecular de alrededor de 25,959 kDa y está compuesta por 247 AA. Una característica de CEMP-1 durante el proceso de biomineralización es la región terminal-N la cual promueve la unión, diferenciación celular, deposición y organización los cristales de HA durante el proceso de biomineralización del cemento radicular. Además, se ha demostrado en los últimos años que CEMP-1 es una proteína que promueve la formación de cristales de HA a partir de un sistema libre de células, mediante propiedades químicas entre iones de Ca y P en un medio semisólido con temperatura y pH controlados. Los resultados obtenidos mediante este sistema, fueron corroborados mediante el uso de técnicas de análisis como microscopia de fuerza atómica, XRD, HRTEM, SEM, FT/IR; las cuales revelaron la estructura tridimensional esferoidal de los cristales de HA formados mediante el sistema, así como su porcentaje/composición mineral, las cuales mostraron similitudes con el proceso de biomineralización *in vitro* de los tejidos mineralizados. (14,23,24,25,26,27,28).

## **Osteonectina (ON)**

La proteína osteonectina (ON) es una proteína presente en tejido óseo, dentinario y ligamento periodontal. Pertenece al grupo de las glicoproteínas y su gen se encuentra en el cromosoma 5 (5q31-q33). Su masa molecular se estima de aproximadamente de 34,613 KDa y está compuesta por 303 AA. Esta proteína cuenta con diferentes dominios de unión: la unión rica en cisteína, un dominio N-terminal ácido que se une a iones de Ca<sup>+</sup> con baja afinidad, y un dominio C-terminal de unión de Ca<sup>+</sup> con alta afinidad. Dentro del proceso de biomineralización, La proteína ON actúa como iniciador y regulador, proceso mediante el cual une los cristales de hidroxiapatita a la colágena, lo que a su vez, le permite liberar iones de Ca<sup>+</sup>.(14,29,30,31,32)

#### Amelogenina

La proteína amelogenina se encuentra presente durante la formación del esmalte dental; su gen se localiza en el cromosoma X. Con una masa molecular de aproximadamente de 21.6 kDa y está compuesta por 191 AA. Posee una región N-terminal con una alta concentración de AA ricos en His, Gln y Pro. Estos AA contribuyen en la conformación, formación y organización del esmalte dental y a la formación de cristales de HA. (14,33,34,35)

# Fosfatasa alcalina (ALP)

La fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína que se encuentra presente en cuatro genes: No especifica de tejido (presente en tejido blando como riñón y hígado y tejido mineralizado óseo), placentaria, de células germinales e intestinal. el gen se localiza en el cromosoma 1 cerca del locus Rh en 1p36.1 con una masa atómica de aproximadamente 57.9 kDa, y está constituida por 535 AA.

ALP es un inhibidor en la formación de HA y generador de fosfato inorgánico, lo que ayuda a generar el proceso de biomineralización en presencia de Ca+. (14,36,37,38,39,40)

En los últimos años, se ha investigado sobre la participación de ciertas regiones de PNC en el proceso de biomineralización, y de cómo estas pueden, inducir la formación y nucleación de cristales de hidroxiapatita. Específicamente, los AA de carga negativa, como el Glu y el Asp, así como de carga positiva como la Arg han demostrado tener esta capacidad. (41,42,43,44,45)

Es por esto, que es de nuestro interés, investigar mediante el uso del sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato, si los AA sin formar enlaces peptídicos tienen la capacidad de formar cristales de fosfato de calcio (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), y en especial, si pueden promover la formación de cristales de HA. Esto es relevante, ya que se puede generar información novedosa sobre el proceso de mineralización y llevar dicho conocimiento a una posible aplicación enfocada a la regeneración de tejidos mineralizados.

# PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En determinados momentos, las personas pueden experimentar defectos o perdidas de tejidos mineralizados, lo cual se manifiesta en diferentes condiciones patológicas como la caries, enfermedad periodontal, fracturas óseas, neoplasias, osteoporosis, entre otros. A pesar de la disponibilidad de las terapias actuales utilizadas para tratar estas condiciones, como las proteínas recombinantes y los péptidos, estás presentan limitaciones importantes, como su alto costo y la posibilidad de defectos secundarios como de sobrecrecimiento óseo y necrosis.

# JUSTIFICACIÓN

Las características en común que tiene muchas de las PNC asociadas al proceso de mineralización hacen evidente el papel fundamental de las regiones enriquecidas en AA ácidos. Esto ha derivado en la generación de péptidos sintéticos derivados de estas regiones y su investigación en la promoción del proceso de mineralización, sin embargo, aún no se ha profundizado en la investigación sobre los componentes individuales de estas regiones peptídicas (AA).

Es por esto, que nuestro trabajo de investigación propone demostrar la capacidad de estos AA, tanto en su forma aislada como en combinación, su capacidad de inducir la nucleación y formación de cristales de HA. Nuestros resultados pueden representar un avance innovador en el conocimiento del proceso de mineralización y eventualmente ayudar a generar nuevas estrategias terapéuticas de tejidos mineralizados.

# **HIPÓTESIS**

El empleo de diferentes AA dentro de un sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato tiene el potencial de promover la nucleación, formación y producción de cristales de HA.

# **OBJETIVOS**

# Objetivo general

Determinar el potencial que tienen diferentes AA de forma aislada y en combinación, en la formación de cristales de HA mediante un sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato.

# **Objetivos específicos**

1.-Conformar el sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato para la formación de cristales de HA.

2.-Incluir diferentes AA, solos y en combinación: Glu, Asp, His, Arg, Ser y Phe en el sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato en diferentes concentraciones 100 µg, 200 µg y 500 µg.

3.-Determinar la microestructura de los diferentes cristales obtenidos del sistema de contradifusión mediante microscopia electrónica de barrido (SEM).

4.-Determinar la composición química y la fase mineral de los cristales mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FT/IR) y análisis de energía dispersiva de rayos X (EDS).

# **METODOLOGÍA**

# Conformación del sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato.

La finalidad de conformar un gel a base de silicato fue establecer un microambiente propicio para la formación y observación directa de cristales de fosfato de calcio. (27), mediante la inducción de AA (solos o en combinación). Para generar el gel de silicato se empleó el amortiguador de pH HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico) con una concentración de 10 mM (pH 7.4), ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a una concentración 1M y silicato de sodio (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) con una concentración 1.06 gr/mL. Estas soluciones se mezclaron en diferentes proporciones, con un volumen final de 5 mL en tubos cónicos de centrifuga de 20 mL.

Con los reactivos antes mencionados, el proceso se dividió en dos fases:

 Se realizaron diversas mezclas en cantidades variables de estas disoluciones con el fin de conformar un gel translucido y, al mismo tiempo, que la mezcla proporcionara un tiempo de manipulación adecuado para estabilizar el pH (7.4) y permitir su inclusión en el sistema de contradifusión libre de células antes de su estado de gelificación.

2) Las pruebas que mostraron los mejores resultados en la primera fase fueron seleccionadas para avanzar a la segunda fase del proceso: consistió en agregar 5 mL de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) 100 mM en la parte superior del gel, para que se dé una precipitación de iones de calcio al interior del gel y se propicie un ambiente con un pH y temperatura controlada, así como una concentración de iones necesarios para la formación de cristales de fosfato de calcio.

#### Conformación del gel de silicato

Se conformaron casetes compuestos por dos losetas de vidrio con dimensiones de 7 cm x 5 cm x 3 mm cada una, las cuales estaban separadas entre sí por un marco de neopreno de grado alimenticio. Estas losetas se unían entre sí por petrolato, parafilm y pinzas metálicas con el fin de prevenir cualquier posible evaporización o filtración del sistema (Imagen 1).



**Imagen 1**. Estructura del sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato, se observa el nivel que ocupan la fase sólida (gel de silicato inferior) y solución de CaCl<sub>2</sub> (superior).

Una vez conformados los casetes, se introdujeron AA aislados, como de Asp, Glu, His, Arg, Ser y Phe en concentraciones totales de 100  $\mu$ g, 200  $\mu$ g y 500  $\mu$ g en cada casete respectivamente. Posteriormente, se preparó el gel con un volumen final de 5 mL en estado líquido en la base de cada sistema. En la parte superior, se añadieron 5 mL de CaCl<sub>2</sub> a una concentración de 100 mM. Una vez con las dos fases, se cerró el sistema y se incubó a una temperatura de 37 ° durante 7 días.

# Recolección de cristales

Finalizado el periodo de incubación de 7 días, se procedió a la recolección de los cristales con la asistencia visual de un microscopio estereoscópico y un instrumento de punta fina de dimensiones 12 mm x 0.33 mm. Los cristales obtenidos del gel de silicato fueron almacenados en tubos de eppendorf de 1.5 mL con el fin de llevar a cabo su análisis microestructural tridimensional mediante SEM, así como para determinar el porcentaje y la fase mineral mediante FT/IR y EDS.

### Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Se seleccionó un cristal representativo de cada AA aislado y en combinación para su posterior observación microestructural tridimensional mediante el uso de SEM. La preparación previa de los cristales para su observación microscópica implico en la fabricación de seis láminas de aluminio con dimensiones de 1 cm x 3 cm. En cada lámina se colocó una cinta doble cara de carbono de 8 mm x 2.5 cm. Preparadas las láminas, se seleccionaron aproximadamente cinco cristales de cada AA en cada lámina, ubicados sobre la cinta doble cara con una distancia de 5 mm entre ellos.

Posteriormente, las muestras fueron recubiertas con oro en una cámara de vacío para su posterior observación en la microscopia electrónica de barrido (microscopio JEOL modelo JSM-6360LV), con el fin de obtener microfotografías de alta resolución y detallada de la microestructura tridimensional de cada cristal.

# Espectroscopia infrarroja por transformada en Fourier (FT/IR)

Los cristales fueron sometidos a un análisis mediante la espectroscopia infrarroja por transformada en Fourier con el uso del espectrómetro FTIR JASCO 4x. El propósito fue determinar la fase mineral de los cristales con el empleo de la biblioteca digital espectral Wiley KnowltlAll Informatics System. La validez del porcentaje de la fase mineral, en este caso, HA, se define si alcanza o excede un valor válido de 95.45 high quality index (HQI).

# Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS)

Se realizó el análisis mediante el equipo JEOL JMS-5900 LV, con la finalidad de determinar la composición elemental de los cristales. Se empleó un mapeo superficial y se utilizó el porcentaje atómico para determinar la fase mineral mediante la relación calcio / fósforo (Ca/P) (y su comparación con datos de referencia para cristales de fosfato de calcio) y el mapeo de elementos en la superficie del cristal.

# RESULTADOS

# Elaboración del gel de silicato

En la primera fase, se llevaron a cabo diversas pruebas para la elaboración del gel de silicato, con el uso de diferentes volúmenes de HEPES, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>. Tras el análisis de los resultados obtenidos, se observó que las pruebas 24, 25 y 26 destacaron por mostrar los mejores resultados basado en términos de composición de las diferentes disoluciones, tiempo de trabajo y translucidez. **(tabla 1)** 

	Composición	Tiempo de gelificado	Translucidez
	<ul> <li>3.2 mL HEPES buffer 10</li> </ul>		
	mM (pH 7.4)		
Prueba 24	$\circ$ 0.5 mL Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> 1.06	5 minutos de	Parcial
	gr/mL	gelificado	
	<ul> <li>1.3 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M</li> </ul>		
	<ul> <li>21µL NaOH 10 N</li> </ul>		
	o 3.25 mL HEPES buffer 10		
	mM (pH 7.4)		
Drucha 25	$\circ$ 0.45 mL Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> 1.06	6 minutos de	Intermedia/Total
TTUEDA 25	gr/mL	gelificado	
	<ul> <li>1.3 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M</li> </ul>		
	ο 21 μL NaOH 10 N		
	<ul> <li>3.3 mL HEPES buffer 10</li> </ul>		
	mM (pH 7,4)		
Drucha 26	o 0.4 mL Na₂SiO₃ 1.06	9 minutos de	Total
Prueba 26	gr/mL	gelificado	
	○ 1.3 mL H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1 M		
	ο 21 μL NaOH 10 N		

Tabla 1. Conformación y propiedades de las pruebas control del gel de silicato.

Estas pruebas fueron sometidas a la segunda fase del estudio, que incluyo la adición de 5 mL de CaCl<sub>2</sub>. Al comparar los resultados finales de translucidez (imagen 2). Se observó que la prueba 26 (C) mostro una mayor difusión de CaCl<sub>2</sub> al interior del gel en comparación con la prueba 25(B). En la prueba 25 (B), se detectaron halos irregulares y de precipitación en el tercio superior del gel. mientras que en la prueba 24 (A), se observó una mayor precipitación de CaCl<sub>2</sub> a lo largo del gel, lo que resulto en la pérdida de su propiedad de translucidez.





De acuerdo con los resultados obtenidos de las pruebas control, el gel con las mejores características se basó en la prueba 26, la cual consistió en la siguiente composición:

- 3.3 mL de HEPES buffer 10 mM (pH 7.4)
- 0.4 mL de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 1.06 gr/mL
- 1.3 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M
- 21 µL de NaOH 10 N

# Visualización directa de los cristales dentro del sistema de contradifusión mediante el uso de microscopio estereoscópico

Completado el tiempo de incubación de las pruebas de formación de cristales de fosfato de calcio con la inducción de AA, se procedió a observar los cristales dentro del sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato de cada AA con el uso de un microscopio estereoscópico (Imagen 3)





**Imagen 3.** Fotografías tomadas mediante microscopio estereoscópico de la prueba control y de cada AA aislado en concentraciones totales de 100 μg, 200 μg y 500 μg. Se observa que en las pruebas donde se formaron cristales, estos son de forma esférica y de color blanco (debido al Ca).

Como resultado de la observación de las pruebas con el microscopio estereoscópico, se asignó un valor cualitativo según la cantidad de cristales esféricos formados con la inducción de los aminoácidos (Tabla 2):

AMINOÁCIDO	100 µg	200 µg	500 µg
Ácido aspártico	Escasa	Escasa	Escasa
Ácido glutámico	Abundante	Abundante	Abundante
Histidina	Abundante	Abundante	Abundante
Arginina	Ninguno	Escasa	Escasa
Serina	Abundante	Abundante	Abundante
Fenilalanina	Abundante	Abundante	Abundante

**Tabla 2.** Resultados de la cantidad de cristales observados en cada sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato con la incorporación de AA en concentraciones de 100 μg, 200 μg y 500 μg

Analizados en los resultados de la tabla anterior, se decidió combinar los AA que demostraron los mejores resultados en términos de producción de cristales de cada sistema.

Predominantemente, se observó que los AA Glu, His, Phe y Ser mostraron resultados prometedores. Por tanto, se procedió a realizar las siguientes combinaciones: His + Glu, Phe + Ser, His + Ser, Glu + Ser, Glu + Phe, His + Phe. Todas estas combinaciones se realizaron con las mismas concentraciones de 100  $\mu$ g, 200  $\mu$ g y 500  $\mu$ g (de cada AA), y fueron sometidas en incubación por 7 días a una temperatura de 37°. Como resultado de este proceso, se obtuvieron las siguientes imágenes a través de la microcopia óptica (imagen 4)



Imagen 4. Fotografías tomadas mediante microscopio estereoscópico de los siguientes grupos A) His+ Glu concentración 100 μg. B) His + Glu concentración de 200 μg. C) His + Glu concentración de 500 μg. D) Glu + Ser 200 μg. E) Glu+ Ser concentración 500 μg. F) His + Ser concentración 500 μg. G) Phe + Ser concentración 500 μg. H) Glu + Phe a concentración 500 μg.

Se asignó un valor cualitativo a la cantidad de cristales esféricos que se formaron con el uso de combinaciones de AA en el sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato, mediante la observación del microscopio estereoscópico **(tabla 3).** 

AMINOÁCIDO	100 µg/mL	200 µg/mL	500 µg/mL
Histidina + Ácido glutámico	Escasa	Escasa	Escasa
Ácido glutámico + Serina	Ninguno	Escasa	Escasa
Histidina + Serina	Ninguno	Ninguno	Escasa
Fenilalanina+ Serina	Ninguno	Ninguno	Escasa
Ácido glutámico + Fenilalanina	Ninguno	Ninguno	Abundante
Histidina + Fenilalanina	Ninguno	Ninguno	Ninguno

**Tabla 3.** Resultados de la combinación de aminoácidos observados mediante microscopio estereoscópico.

### Caracterización tridimensional mediante el uso de SEM

Posterior al recubrimiento con oro, se procedió a montar los cristales en el portaobjetos del microscopio electrónico de barrido (SEM) para obtener microfotografías estructurales tridimensionales. Se emplearon diferentes aumentos de 220x, 500x, 1500x, 2500x, 5000x y 15000x, para cada cristal inducido con AA aislados y en combinación, así como para la muestra control sin AA.

## Prueba control sin aminoácidos

Microfotografías estructurales tridimensionales con el uso de microscopia electrónica de barrido (SEM) de la prueba control sin AA, tal como se muestra en la imagen 5. En la microfotografía A) Se observa una estructura plana, con dimensiones aproximadas de 2.00 mm y 1.17 mm de longitud. B) Posee una superficie homogénea lisa. C) y D) la cual se encuentra conformado por varias capas lisas y planas con terminación en punta.



Imagen 5. Microfotografías tridimensionales de la prueba control sin la adición de aminoácidos. A) 40x, B) 220x, C) 5000x y E) 5000x

# Ácido aspártico 100 µg

Las microfotografías de la imagen 6, se observa una A) Estructura irregular fusionada con una placa lisa, B) Ambas superficies homogéneas. C) y D) Presentan prolongaciones delgadas fusionadas y planas emergentes del núcleo de la estructura, cada una con terminación desdentada, con un ancho promedio de aproximadamente de 5 µm



**Imagen 6.** Microfotografías tridimensionales de los cristales inducidos con Asp a una concentración de 100 μg con diferentes aumentos de A) 200 x, B) 2 500 x, C) 5 000x y D)15 000 x.

# Ácido aspártico 200 µg

En las microfotografías de la imagen 7, A) Se observa un cristal esferoidal similar a una drusa de aproximadamente 362 µm de diámetro. B) Cuenta con una superficie homogénea que está formada por múltiples cristales planos y alargados que se agrupan y dejan espacios que forman poros. C) y D) Contiene diferentes prolongaciones de terminación en forma triangular o en cuadrado con un ancho promedio de aproximadamente de 1.48 µm



**Imagen 7.** Microfotografías tridimensionales de los cristales inducidos con Asp a una concentración de 200 μg con diferentes aumentos de A) 200x, B) 2 500x, C) 5 000x y D) 15 000x.

# Ácido aspártico 500 µg

En las microfotografías de la imagen 8, A) Se observan dos estructuras esferoidales similares a una drusa fusionadas de dimensiones de aproximadamente  $137 \mu m x 166 \mu m y 112 \mu m x 130 \mu m$  con exposición de núcleo de donde emergen de forma radial múltiples cristales. B) Cuentan con una superficie homogénea conformada por múltiples cristales largos y finos que se agrupan y dejan espacios formando poros. C) y D) Contiene prolongaciones fusionadas con terminación en forma de flecha, las cuales en su forma individual cuenta con un ancho promedio de aproximadamente 1,11  $\mu m$ .



**Imagen 8.** Microfotografías tridimensionales de los cristales inducidos con Asp a una concentración de 500 μg con aumentos de A) 200x, B) 2500x, C) 5000x y D) 15000x

# Ácido glutámico 100 µg

Las microfotografías de la imagen 9, A) Se observa una estructura esferoidal similar a una drusa de dimensiones de 360  $\mu$ m x 327 $\mu$ m con exposición de núcleo de donde emergen de forma radial múltiples cristales planos y alargados de dimensiones. B) Cuenta con una superficie homogénea conformada por múltiples cristales planos y alargados que se agrupan y dejan espacios formando poros. C) y D) Contiene prolongaciones con terminación marcada en forma de flecha de las cuales cuentan con un ancho promedio de aproximadamente 4.75  $\mu$ m.



**Imagen 9.** Microfotografías tridimensionales de los cristales inducidos con Glu a una concentración de 100 μg con aumentos de A) 200x, B) 2 500x, C)5 000x y D) 15000x

# Ácido glutámico 200 µg

Las microfotografías de la imagen 10, A) Se observa una estructura esferoidal lobulada similar a una drusa de dimensión de 237 µm de diámetro. B) Cuenta con una superficie homogénea formada por múltiples cristales planos y alargados de proyección radial emergente a partir del núcleo de la estructura, las cuales se agrupan y dejan espacios formando poros. C) y D) Contiene diferentes terminaciones en sus prolongaciones, en su mayoría, en forma de cuadrado y flecha con un ancho promedio de aproximadamente 4.2 µm.



**Imagen 10.** Microfotografías tridimensionales de los cristales inducidos con Glu a una concentración de 200 μg con aumentos de A) 200x, B) 2 500x, C) 5 000x y D)15 000x

# Ácido glutámico 500 µg

Las microfotografías la imagen 11. A) Se observa una estructura esferoidal similar a una drusa de dimensiones de 365  $\mu$ m x 418  $\mu$ m. B) Cuenta con una superficie homogénea constituida por cristales largados de diferente tamaño y ancho de proyección radial, los cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros. C) y D) Contiene prolongaciones, en su mayoría, en forma de aguja y flecha de un ancho promedio de aproximadamente 1.5  $\mu$ m.



**Imagen 11.** *Microfotografías tridimensionales de cristales inducidos con Glu a una concentración de 500 μg con aumentos de A) 200x, B) 2 500x, C) 5 000x y D) 15000x* 

# Histidina 100 µg

Las microfotografías de la imagen 12. A) Se observa una estructura esferoidal similar a una drusa de dimensiones de 214  $\mu$ m x 222  $\mu$ m. B) Cuenta con una superficie homogénea constituida por múltiples cristales planos, anchos y alargados de proyección radial, los cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros. C) y D) Contiene cristales planos, fusionados unos con otros, los cuales conforman las prolongaciones anchas y planas de terminación cuadrada, con un ancho promedio de aproximadamente de 7.6  $\mu$ m, así como la observación de la presencia de cristales delgados y curvos entre las prolongaciones.



**Imagen 12**. Microfotografías tridimensionales de los cristales inducidos con His a una concentración de 100 μg con aumentos de A) 200x, B) 2500x, C) 5000x y D)15000x

# Histidina 200 µg

Las microfotografías de la imagen 13, A) Se observa una estructura esferoidal similar a una drusa con dimensiones de 325  $\mu$ m x 318  $\mu$ m. B) Cuenta con una superficie homogénea de patrón en arreglo en espiral conformado por cristales planos, finos y alargados de proyección radial. C) y D) Contiene prolongaciones delgadas y finas, con cierta curvatura, que a su vez se encuentran fusionadas en su extremo final por fibras que semejan una matriz. Estos cristales presentan, en su mayoría, una terminación cuadrada de un ancho promedio de aproximadamente 0.44  $\mu$ m.



**Imagen 13**. Microfotografías tridimensionales de los cristales inducidos con His a una concentración de 200 μm con aumentos de A) 220x, B) 2 500x, C) 5 000x y D) 15000x

# Histidina 500 µg

Las microfotografías de la imagen 14. A) Se observa una estructura plana, gruesa y lisa. B) Cuenta con una superficie homogénea y lisa con presencia de gel en algunas áreas. C) y D) Se encuentra estructurado por múltiples placas que conforman la estructura, otorgando un borde irregular.



**Imagen 14**. Microfotografías tridimensionales de los cristales inducidos con His a una concentración de 500 μg con aumentos de A)220x, B)1 500x, C)5 000x y D)15 000x

# Arginina 200 µg

Las microfotografías de la imagen 15, A) Se observa una estructura esferoidal similar una drusa con dimensiones de 195  $\mu$ m x 247  $\mu$ m. B) Cuenta con una superficie homogénea constituida por múltiples cristales planos y anchos de proyección radial, los cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros. C) y D) Contiene prolongaciones de diversos grosores que emergen del núcleo, en su mayoría, prolongaciones delgadas y anchas, con terminaciones desdentadas y en punta, respectivamente, y un ancho promedio de aproximadamente de 3.65  $\mu$ m



**Imagen 15**. Microfotografías tridimensionales del cristal inducido con Arg a una concentración de 200 μg con aumentos de A)200x, B) 2 500x, C)5 000x y D)15 000x
## Arginina 500 µg

Las microfotografías de la imagen 16, A) Se observa una estructura esferoidal similar a una drusa con dimensiones de 213  $\mu$ m x 216  $\mu$ m. B) Contiene una superficie homogénea constituida por múltiples cristales planos y anchos de proyección radial, los cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros. C) y D) Contiene prolongaciones anchas, planas y delgadas que emergen del núcleo, la mayoría, con terminación desdentada o en cuadrado con bordes redondeados, los cuales son de un grosor promedio de aproximadamente de 3.9  $\mu$ m.



**Imagen 16.** Microfotografías tridimensionales del cristal inducido con Arg a una concentración de 500 µg con aumentos de A) 200x, B) 2,500x, C) 5,000x y D)15 000x

#### Serina 100 µg

Las microfotografías de la imagen 17, A) Se observa una estructura esferoidal similar a una drusa con dimensiones de 339  $\mu$ m x 337  $\mu$ m. B) Contiene una superficie homogénea constituida por múltiples cristales largos, planos y delgados de proyección radial, los cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros. C) y D) Cuenta con prolongaciones largas y planas de diferentes grosores con terminación cuadrada y en flecha de bordes redondeados con un ancho promedio de aproximadamente de 1.12  $\mu$ m



**Imagen 17.** Microfotografías tridimensionales del cristal inducido por Ser a una concentración de 100 μg con aumentos de A)220x, B)2 500x, C)5 000x y D)15 000x

#### Serina 200 µg

Las microfotografías de la imagen 18, A) Se observa una estructura esferoidal similar a una drusa multilobulada con dimensiones de 390 µm x 392 µm. B) Contiene una superficie homogénea constituida por múltiples cristales planos y anchos de proyección radial, los cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros. C) y D) Cuenta con prolongaciones que emergen del núcleo, la mayoría, con terminación desdentada o cuadrado con bordes circulares, fusionados entre algunos de estas mismas prolongaciones de un ancho promedio de aproximadamente 3.65 µm



**Imagen 20.** Microfotografías tridimensionales del cristal inducido por Ser a una concentración de 200 μg con incrementos de A)200x, B)1 500x, C)2 500x y D)15 000x

### Serina 500 µg

En las microfotografías de la imagen 21. A) Se observa una estructura esferoidal similar a una drusa con dimensiones de 252 µm x 253 µm. B) Cuenta con una superficie homogénea conformada por múltiples cristales planos y anchos de proyección radial, los cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros. C) y D) Contiene prolongaciones que emergen del núcleo de terminación desdentada o en cuadrado de un ancho promedio de 2.2 µm



Imagen 21. Microfotografías tridimensionales del cristal inducido por Ser a una concentración de 500 μg con incrementos de A) 220x, B) 2 500x, C)5 000x y D)15 000x

#### Fenilalanina 100 µg

En las microfotografías de la imagen 22, A) Se observa una estructura esferoidal similar a una drusa con dimensiones de 338  $\mu$ m x 329  $\mu$ m. B) Contiene una superficie homogénea conformada por múltiples cristales planos, finos y alargados de proyección radial, los cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros. C) y D) Cuenta con prolongaciones delgadas y finas de forma paralelepípedos diferentes tamaños y grosores, con cierta curvatura emergente del núcleo. Las prolongaciones se encuentran fusionadas en el extremo final por fibras que semejan una matriz. Tienen estas prolongaciones, una terminación cuadrada y por un ancho promedio de aproximadamente 0.65  $\mu$ m



**Imagen 22**. Microfotografías tridimensionales del cristal inducido por Phe a una concentración de 100 μg con aumentos de A)220x, B)2 500x, C)5 000x y D)15 000X

#### Fenilalanina 200 µg

En las microfotografías de la imagen 23, A) Se observa una estructura esferoidal similar a una drusa con dimensiones de 355 µm x 352 µm. B) Contiene una superficie homogénea conformada por múltiples cristales delgados y finos, con cierta curvatura en su extremo del núcleo y fusionados en el extremo final por fibras que semejan una matriz, los cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros. C) y D) Cuenta con prolongaciones extremadamente finas de terminación en flecha o circular, con un ancho promedio aproximado de 0.45 µm.



**Imagen 23**. Microfotografías tridimensionales del cristal inducido por Phe a una concentración de 200 μg con aumentos de A)220x, B)2 500x, C)5 000x y D)15 000x

### Fenilalanina 500 µg

Las microfotografías de la imagen 24, A) Se observa una estructura esferoidal similar a una drusa con dimensiones de 297  $\mu$ m x 304  $\mu$ m. B) Cuenta con una superficie homogénea conformada por múltiples cristales delgados y finos que emergen del núcleo de proyección radial, fusionados en el extremo final por ligeras fibras que asemejan una matriz, las cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros. C) y D) Contiene prolongaciones con terminación en flecha o circular de un ancho promedio de aproximadamente 1.05  $\mu$ m



**Imagen 24**. Microfotografías tridimensionales del cristal inducido por Phe a una concentración de 500 μg con aumentos de A)200x, B)1 500x, C)2 500x y D)15 000x

## Histidina + Ácido glutámico 100µg

En las microfotografías de la imagen 25, A) Se observa una estructura esferoidal con similitud a una drusa con una dimensión de 331 µm. B) Contiene una superficie homogénea conformada por múltiples cristales delgados y finos que emergen del núcleo de patrón cerebro de proyección radial, las cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros. C) y D) Cuenta con prolongaciones se encuentran fusionadas en su extremo final, algunas con cierta curvatura antes de su fusión, cuentan con terminaciones, en su mayoría, en forma de triangulo y cuadrado de un ancho promedio de aproximadamente 1.29 µm.



**Imagen 25**. Microfotografías tridimensionales del cristal inducido por His + Glu a una concentración de 100µg con aumentos de A)220x, B)2 500x, C)5 000x y D)15 000x

## Histidina + Ácido glutámico 200 µg

En las microfotografías de la imagen 26, A) se observa una estructura esferoidal con similitud a una drusa con dimensión de 255 µm. B) Cuenta con una superficie homogénea conformada por múltiples cristales planos, anchos y delgados que emergen del núcleo con proyección radial, las cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros. C) y D) Contiene prolongaciones con terminación desdentada con un ancho promedio de aproximadamente 3.2 µm



**Imagen 26**. Microfotografías tridimensionales del cristal inducido por His + Glu a una concentración de 200 μg con aumentos de A)200x, B)2 500x, C)5 000x y D)15 000x

## Histidina + Ácido glutámico 500µg

En las microestructuras de la imagen 27, A) se observa una estructura esferoidal similar a una drusa con dimensión de 245 µm. B) Contiene una superficie homogénea compuesta por múltiples cristales planos y anchos que emergen del núcleo de proyección radial, las cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros. C) Y D) Cuenta con prolongaciones delgadas con una marcada terminación desdentada, las cuales, en su mayoría, tienen un ancho promedio de aproximadamente 1.68 µm



**Imagen 27**. Microfotografías tridimensionales del cristal inducido por His + Glu a una concentración de 500µg con aumentos de A)220x, B)2 500x, C) 5 000x y D)15 000x

# Ácido glutámico + Serina 200 µg

En las microfotografías de la imagen 28, A) Se observa una estructura esferoidal similar a una drusa con exposición de núcleo de dimensiones de 223  $\mu$ m x 244  $\mu$ m. B) Contiene una superficie homogénea conformada por múltiples cristales irregulares que emergen del núcleo de la estructura de proyección radial. C) y D) El núcleo cuenta con una superficie homogénea irregular de donde emergen las prolongaciones del cristal de un ancho promedio de 1.09  $\mu$ m



**Imagen 28**. Microfotografías tridimensionales del cristal inducido por Glu + Ser a una concentración de 200 μg con incrementos de A)220x, B)2 500x, C)5 000x y D)15 000x

## Ácido glutámico + Serina 500 µg

Las microfotografías de la imagen 29, A) Se observa una estructura esferoidal fusionada similar a una drusa con dimensión de 300 µm. B) Contiene una superficie homogénea constituida por múltiples cristales delgados y finos de proyección radial, las cuales se agrupan y dejan espacios similares a poros, así como una placa plana, resultante de la fusión de ambas estructuras.

C) y D) Cuenta con prolongaciones de terminación en punta fina de un ancho promedio aproximado de 0.24 µm, la mayoría, fusionados con otros, lo que conforma en grupo, terminaciones triangulares.



**Imagen 29**. Microfotografías tridimensionales del cristal inducido por Glu + Ser a una concentración de 500 μg con aumentos de A)220x, B)2 500x, C)5 000x y D)15 000x

#### Fenilalanina + Serina 500 µg

En las microfotografías de la imagen 30, A) se observa una estructura esferoidal similar a una drusa con dimensiones de 282 µm x 272 µm. B) Cuenta con una superficie homogénea constituida por múltiples cristales delgados y largos que se agrupan y dejan espacios similares a poros de patrón de red de proyección radial. C) y D) Contiene prolongaciones fusionadas de terminación cuadrado cubiertas por fibras similares a una matriz de un ancho promedio de 4.29 µm



**Imagen 30**. Microestructura tridimensional del cristal inducido por Phe + Ser a una concentración de 500 μg con aumentos de A)220x, B)2 500x, C)5 000x y D)15 000x

#### Histidina + Serina 500 µg

En las microfotografías de la imagen 31, A) Se observa una estructura esferoidal similar a una drusa con dimensión de 181  $\mu$ m. B) Contiene una superficie homogénea compuesta por múltiples cristales anchos y planos que se agrupan y dejan espacios similares a poros con proyección radial. C) y D) Contiene prolongaciones fusionadas de terminación desdentada con un ancho promedio de aproximadamente 0.6  $\mu$ m



**Imagen 31**. Microfotografías tridimensionales del cristal inducido por His + Ser a una concentración de 500 μg con aumentos de A)200x, B)2 500x, C)5 000x y D)15 000x

### Ácido glutámico + Fenilalanina 500 µg

En las microfotografías de la imagen 32, A) Se observa una estructura de dimensiones de 402 µm. B) Contiene una superficie homogénea conformada por múltiples cristales largos y finos, dispuestos radialmente como pétalos de cempasúchil de punta fina de proyección radial con presencia de microcristales esferoidales entre ella. C) y D) Contiene prolongaciones finas de un ancho promedio de aproximadamente 0.6 µm, así como la presencia de microcristales esferoidales similares al cempasúchil.



**Imagen 32**. Microfotografías tridimensionales de Glu + Phe a una concentración de 500 μg con aumentos de A)220x, B)1 500x, C)5 000x y D)15 000x

Las dimensiones microestructurales y terminaciones de cada cristal inducido con diferentes AA, obtenidas mediante microfotografías SEM, se presentan en la **tabla 4**:

Aminoácidos µg	Medida estructural	Terminación	
		Forma	Medida
Prueba control	3.27 mm	Plana	2.7 µm
Ácido aspártico 100 µm	-	Irregular/Plana	5 µm
Ácido aspártico 200 μm	362 µm	Triangular/ Cuadrado	1.48 µm
Ácido aspártico500 μm	1.37 µm x 166 µm	Flecha	1.11 µm
	112 µm x 130 µm		
Ácido glutámico 100 µm	260 µm x 327 µm	Flecha	4.75 µm
Ácido glutámico 200 μm	237 µm	Cuadrado/	4.2 µm
		Flecha	
Ácido glutámico 500 μm	365 µm x 418 µm	Aguja/Flecha	1.5 µm
Histidina 100 µg	214 µm x 220 µm	Cuadrado	7.5 µm
Histidina 200 μg	325 µm x 318 µm	Cuadrado	0.44 µm
Histidina 500 µg	-	Borde irregular	3.81 µm
Arginina 200 μg	195 µm x 274 µm	Desdentada	3.5 µm
Arginina 500 μg	213 µm x 218 µm	Desdentada/ Cuadrado	3.9 µm
Serina 100 µg	339 µm x 337 µm	Cuadrado/Flecha	1.12 µm
Serina 200 μg	390 µm x 392 µm	Desdentada/ Cuadrado	3.65 µm
Serina 500 µg	252 µ x 253 µm	Desdentada/ Cuadrado	2.2 µm
Fenilalanina 100 µg	338 µm x 329 µm	Cuadrado	0.65 µm
Fenilalanina 200 μg	352 µm x 355 µm	Cuadrado/ Circular	0.45 µm
Fenilalanina 500 µg	297 µm x 304 µm	Flecha/Cuadrado	1.05 µm
Histidina + Ácido glutámico 100 μg	331 µm	Triangular/ Cuadrada	1.29 µm
Histidina + Ácido glutámico 200 μg	255 µm	Desdentada	3.2 µm
Histidina + Ácido glutámico 500 μg	245 µm	Desdentada	1.68 µm
Ácido glutámico + Serina 200µg	223 µm x 244 µm	Irregular	1.48 µm
Ácido glutámico+ Serina 500 μg	300 µm	Aguja fina / Triangular	0.24 µm
Fenilalanina + Serina 500 µg	282 µm x 272 µm	Cuadrado	4.29 µm
Histidina + Serina 500 μg	181 µm	Desdentada	0.6 µm
Ácido glutámico + Fenilalanina 500 μg	402 µm	Punta fina	0.6 µm

**Tabla 4.** Análisis estructural mediante el uso de SEM de cada cristalrepresentativo inducido por AA.

### Análisis de composición química FT/IR

Se coloco un cristal en el portamuestras por cada AA solo o combinación en el del equipo FT/IR con el fin de obtener espectros que caracterizan la composición química de cada cristal representativo, para la obtención de dos tipos de espectros : un espectro generado por los cristales inducidos con AA y la prueba control, y otro espectro de referencia obtenido por la biblioteca del equipo ,que en la mayoría de los casos, por hidroxiapatita, así como el registro del nombre, composición, estructura, HQI, BD e ID.

#### **Prueba control**

En la imagen 33, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal plano e irregular sin el uso de AA. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal sin el uso de AA y el espectro rojo correspondiente a fosfato trisódico. Ambos espectros distintivos con un bajo índice HQI de 91.84



**Imagen 33**. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio. Se muestran los espectros generados sin el uso de AA (representado en azul) con el espectro de referencia de fosfato de calcio (representado en rojo) proporcionando por la biblioteca del equipo, en la cual se evaluó la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, fosfato tricálcico.

### Ácido aspártico 100 µg

En la imagen 34, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Asp con una concentración total de 100 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con Asp y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de valor HQI de 96.39



**Imagen 34**. Espectro FT/IR del cristal de HA inducido con Asp a una concentración de 100 µg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo; así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

## Ácido aspártico 200 µg

En la imagen 35, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Asp con una concentración total de 100 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con Asp y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de un valor HQI de 96.83



Imagen 35. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Asp a una concentración de 200 µg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto, estructura y espectro detectado, en este caso, HA.

### Ácido aspártico 500 µg

En la imagen 36, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Asp con una concentración total de 500 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con Asp y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de valor HQI de 24.66



**Imagen 36**. Espectro FT/IR del fosfato de calcio inducido con Asp a una concentración de 500 μg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca en la cual se evaluó la calidad de la muestra con el uso de índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro esperado, en este caso, HA

# Ácido glutámico 100 µg

En la imagen 37, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Glu con una concentración total de 100 µg. Se observa dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido por Glu y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una similitud en su pico más alto de un valor HQI de 85.83



Imagen 37. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Glu a una concentración total de 100 μg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca, en la cual se evalúa la calidad de la muestra mediante el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

# Ácido glutámico 200 µg

En la imagen 38, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Glu a una concentración total de 200 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con Glu y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de un valor HQI de 97.42



**Imagen 38.** Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Glu a una concentración de 200 µg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA

# Ácido glutámico 500 µg

En la imagen 39, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal con Glu con una concentración total de 500 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con Glu y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de un valor HQI de 99.20



**Imagen 39.** Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Glu a una concentración total de 500 μg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA

### Histidina 100 µg

En la imagen 40, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con His con una concentración total de 100 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul corresponde al cristal inducido con His y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de valor HQI de 99.10



**Imagen 40.** Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con His a una concentración de 100 μg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

# Histidina 200 µg

En la imagen 41, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con His con una concentración total de 200 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con His y el espectro rojo a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de valor HQI de 97.88



**Imagen 41**. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con His a una concentración de 200 µg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

### Histidina 500 µg

En la imagen 42, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con His con una concentración total de 500 µg. Se observa dos espectros: el espectro azul corresponde al cristal inducido con His y el espectro rojo correspondiente fosfato de calcio. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de valor HQI de 78.31



**Imagen 42**. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con His a una concentración total de 500 μg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de fosfato de calcio (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado en este caso, fosfato de calcio.

## Arginina 200 µg

En la imagen 43, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Arg con una concentración total de 200 µg. Se observa dos espectros, el espectro azul correspondiente al cristal inducido con Arg y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de valor HQI de 97.70



**Imagen 43.** Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Arg a una concentración total de 200µg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en el cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

# Arginina 500 µg

En la imagen 44, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Arg con una concentración total de 500 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul corresponde al cristal inducido con Arg y el espectro rojo corresponde a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud de su pico más alto de valor HQI de 97.89



**Imagen 44.** Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Arg a una concentración total de 500 μg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en el cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

### Serina 100 µg

En la imagen 45, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Ser con una concentración total de 100 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con Ser y el espectro rojo correspondiente a HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su punto más alto de valor HQI de 98.42



**Imagen 45.** Espectro FT/IR de fosfato de calcio inducido con Ser a una concentración total de 100 μg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa a calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

### Serina 200 µg

En la imagen 46, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Ser con una concentración total de 200 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con Ser y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de valor HQI de 98.52



**Imagen 46**. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Ser a una concentración de 200 µg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de in índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

# Serina 500 µg

En la imagen 47, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Ser con una concentración total de 500 µg. Se observan dos espectros: el espectro correspondiente al cristal inducido con Ser y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de valor HQI de 99.11



Imagen 47. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Ser a una concentración de 500 μ. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

### Fenilalanina 100 µg

En la imagen 48, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Phe con una concentración total de 100 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con Phe y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de valor HQI de 99.05



**Imagen 48**. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Phe a una concentración de 100 µg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

#### Fenilalanina 200 µg

En la imagen 49, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Phe con una concentración total de 200 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con Phe y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de valor HQI de 99.12



**Imagen 49**. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Phe a una concentración total de 200 μg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

## Fenilalanina 500 µg

En la imagen 50, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Phe con una concentración total de 500 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con Phe y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud de pico más alto de valor HQI de 97.50



**Imagen 50**. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Phe a una concentración de 500 μg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

# Histidina + Ácido glutámico

En la imagen 51, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con His + Glu con una concentración total de 100 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con His + Glu y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud de su pico más alto de valor HQI de 94.69



**Imagen 51**. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con His + Glu a una concentración total de 100 µg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.
# Histidina + Ácido glutámico 200 µg

En la imagen 52, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con His + Glu con una concentración total de 200 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con His + Glu y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud de su pico más alto de valor HQI de 99.09



**Imagen 52**. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con His + Glu a una concentración total de 200 µg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (representado en azul) con el espectro de referencia de HA (representado en rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

# Histidina + Ácido glutámico 500 µg

En la imagen 53, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con His + Glu con una concentración total de 500 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con His + Glu y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud de su pico más alto de valor HQI de 98.10



**Imagen 53.** Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con His + Glu a una concentración de 500 μg. Se muestran los espectros generados con el uso del AA (espectro azul) con el espectro de referencia de HA (espectro rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto, estructura y espectro detectado, en este caso, HA.

### Ácido glutámico + Serina 200 µg

En la imagen 54, se presenta la espectroscopia FT/Ir del cristal inducido con Glu + Ser con una concentración total de 200 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul corresponde al cristal inducido con Glu + Ser y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud en su pico más alto de valor HQI de 45.16



**Imagen 54**. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Glu + Ser a una concentración de 200 µg. Se muestran los espectros generados con el uso de los AA (espectro azul) con el espectro de referencia de HA (espectro rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y estructura relacionada, en este caso, HA.

# Ácido glutámico + Serina 500 µg

En la imagen 55, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Glu + Ser con una concentración total de 500 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul correspondiente al cristal inducido con Glu + Ser y el espectro rojo correspondiente a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud de su pico más alto de valor HQI de 98.10



**Imagen 55**. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Glu + Ser a una concentración total de 500 µg. Se muestran los espectros generados con el uso de los AA (espectro azul) con el espectro de referencia de HA (espectro rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en el cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro detectado, en este caso, HA.

#### Fenilalanina + Serina 500 µg

En la imagen 56, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Phe + Ser con una concentración total de 500 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul corresponde al cristal inducido con Phe + Ser y el espectro rojo corresponde a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud de su pico más alto de valor HQI de 58.46



**Imagen 56.** Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Phe + Ser a una concentración de 500 μg. Se muestran los espectros generados con el uso de los AA (espectro azul) con el espectro de referencia de HA (espectro rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro con el que está relacionado, en este caso, HA.

#### Histidina + Serina 500 µg

En la imagen 57, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con His + Ser con una concentración total de 500 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul corresponde al cristal inducido con His + Ser y el espectro rojo corresponde a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud de su pico más alto de valor HQI de 46.90



Imagen 57. Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con His + Ser a una concentración total de 500 μg. Se muestran los espectros generados con el uso de AA (espectro azul) con el espectro de referencia de la HA (espectro rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo; así como el compuesto y espectro relacionado, como en este caso, HA.

### Ácido glutámico + Fenilalanina 500 µg

En la imagen 58, se presenta la espectroscopia FT/IR del cristal inducido con Glu + Phe con una concentración total de 500 µg. Se observan dos espectros: el espectro azul corresponde al cristal inducido con Glu + Phe y el espectro rojo corresponde a la HA. Ambos espectros correlacionados con una alta similitud de su pico más alto de valor HQI de 99.08



**Imagen 58.** Espectro FT/IR del cristal de fosfato de calcio inducido con Glu + Phe a una concentración total de 500 µg. Se muestran los espectros generados con el uso de AA (espectro azul) con el espectro de referencia de HA (espectro rojo) proporcionado por la biblioteca del equipo, en la cual se evalúa la calidad del cristal con el uso de los índices HQI, BD e ID de acuerdo con la biblioteca del equipo, así como el compuesto y espectro relacionado, en este caso, la HA. En la **tabla 5**, se enlistaron los valores HQI inducidos por el uso de AA así como de la prueba control, organizados de mayor a menor, a partir de los espectros FT/IR

Aminoácido µg/ mL		HQI
Acido glutámico	500 µg/ mL	99.20
Fenilalanina	200 µg/mL	99.12
Serina	500 μg/mL	99.11
Histidina + Acido glutámico 200 µg/mL		99.09
Acido glutámico + Fenilalanina 500 µg/mL		99.08
Fenilalanina	100 µg/mL	99.05
Serina	200 µg/mL	98.52
Serina	100 µg/mL	98.42
Acido glutámico + Serina 500 µg/mL		98.10
Histidina + acido glutámico 500 µg/mL		98.10
Arginina	500 μg/mL	97.89
Histidina	100 µg/mL	97.88
Arginina	200 µg/mL	97.70
Fenilalanina	500 µg/mL	97.50
Acido glutámico	200 µg/mL	97.42
Acido aspártico	200 µg/ mL	96.83
Acido aspártico	500 µg/mL	96.39
Histidina + Acido glutá	mico 100 μg/ mL	94.69
Histidina	200 µg/mL	93.08
Acido glutámico	100 µg/mL	85.83
Histidina	500 µg/mL	78.31
Fenilalanina + Serina 500 µg/mL		58.46
Histidina + Serina	500 µg/mL	46.90
Acido glutámico + serina 200 µg/mL		45.16
Acido aspártico	100 µg/mL	24.66

Tabla 5. Valores HQI de orden mayor a menor obtenidos mediante el uso de

FT/IR poner la fase mineral que se obtuvo.

#### Análisis del porcentaje de la fase mineral mediante EDS

Los análisis de energía dispersiva de rayos X nos permitieron identificar los elementos constitutivos de los cristales inducidos con los diferentes aminoácidos y del control, así como la distribución del calcio y fosforo en la superficie de los cristales. Además, se utilizó el porcentaje atómico para determinar la fase de mineralización de los cristales al ser comparado con valores de referencia para cristales de fosfato de calcio. (27)

### **Prueba control**

En la imagen 59, se presenta el espectro EDS del cristal plano sin el uso de AA. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 53.8% para Ca y 46.2% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.16, el cual corresponde al valor de brushita



Imagen 59. A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio sin el uso de AA. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde a la superficie del cristal. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa al P), la distribución de los elementos es homogénea.

# Ácido aspártico 100 µg

En la imagen 60, se aprecia el espectro EDS del cristal inducido con Asp a una concentración total de 100  $\mu$ g. Se observan picos mayoritarios para calcio y fosforo con un porcentaje atómico de 62.8% para Ca y 37.2% para P. Al realizar la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.68, el cual corresponde a HA.



**Imagen 60**. *A*) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con Asp a una concentración de 200 μg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la forma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de os cristales de estructura mineral tipo drusa, C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color amarillo representa a Ca y el color rosa representa P), la distribución de los elementos es homogénea.

# Ácido aspártico 200 µg

En la imagen 61, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Asp a una concentración total de 200 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 62.7% para Ca y 37.3% para P. Al hacer la relación Ca / P se obtiene un valor de 1.68, el cual corresponde al valor de la HA.



**Imagen 61**. *A*) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con Asp a una concentración de 200 μg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa al P), la distribución de los elementos es homogénea.

# Ácido aspártico 500 µg

En la imagen 62, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Asp a una concentración total de 500 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 62.5% Ca y 37.5% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.66, el cual corresponde al valor de HA



**Imagen 62**. A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con Asp a una concentración de 500 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal B) Se presenta la zona de la forma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color amarillo representa al Ca y el color rosa representa a P), la distribución de los elementos es homogénea.

# Ácido glutámico 100 µg

En la imagen 63, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Glu a una concentración total de 100 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 59.6% Ca y 40.4 % para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.47, el cual corresponde al valor de Whitlockita



**Imagen 63.** A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calco inducido con Glu a una concentración de 100 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa a Ca y el color P representa al P), la distribución de los elementos es homogénea.

# Ácido glutámico 200 µg

En la imagen 64, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Glu a una concentración total de 200 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 62.2% para Ca y 37.8% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.64, el cual corresponde al valor de la HA.



**Imagen 64.** *A)* Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con Glu a una concentración de 200 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. *B)* Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa al P), la distribución de los elementos es homogénea.

# Ácido glutámico 500 µg

En la imagen 65, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Glu a una concentración total de 500 µg. Se observan picos mayoritarios para calcio y fosforo con un porcentaje atómico de 61.6% para Ca y 38.4% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.60, el cual corresponde al valor de la HA.



**Imagen 65**. *A*) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con Glu a una concentración de 500 μg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de no de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color amarillo representa al Ca y el color rosa representa P), la distribución de los elementos es homogénea.

#### Histidina 100 µg

En la imagen 66, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con His a una concentración total de 100 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 61.8% para Ca y 39.2% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.57, el cual corresponde al valor de HA.



**Imagen 66.** A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con His a una concentración de 100 μg. En el recuadro de la imagen A) se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa al P), la distribución de los elementos es homogénea

#### Histidina 200 µg

La imagen 67, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con His a una concentración total de 200 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 61.6% para Ca y 38.4% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.60, el cual corresponde al valor de HA.



**Imagen 67**. A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con His a una concentración total de 200 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color amarillo representa Ca y el color rosa representa P), la distribución de los elementos es homogénea.

### Histidina 500 µg

En la imagen 68, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con His a una concentración total de 500 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 56.3 % para Ca y 43.7% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene el valor de 1.28, el cual corresponde a un valor de Fosfato octacalcico.



**Imagen 68.** A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con His a una concentración total de 500 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de la estructura irregular. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa Ca y el color amarillo representa P), la distribución de los elementos es homogénea.

### Arginina 200 µg

En la imagen 69, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Arg con una concentración total de 200 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 61.8% para Ca y 38.2% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.61, el cual corresponde al valor de la HA.



**Imagen 69. A**) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con His a una concentración total de 200 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa P), la distribución de los elementos es homogénea.

### Arginina 500 µg

En la imagen 70, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Arg a una concentración total de 500 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 61.7% para Ca y 38.3% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.61, el cual corresponde al valor de la HA.



**Imagen 70.A)** Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con His a una concentración de 500 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa para Ca y el color amarillo para P), la distribución de los elementos es homogénea

#### Serina 100 µg

En la imagen 71, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Ser a una concentración total de 100  $\mu$ g. Se observa picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 59.0% para Ca y 41.0% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.43 que corresponde a whitlockita.



Imagen 71. A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con Ser con una concentración total de 100 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de a toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de os cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa corresponde a Ca y el color amarillo representa P), la distribución de los elementos es homogénea

### Serina 200 µg

En la imagen 72, se presenta el espectro EDS del cristal inducido por Ser con una concentración total de 200  $\mu$ g. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 61.9 % para Ca y 38.1% para P. Al hacer la relación de Ca / P, se obtiene un valor de 1.62, el cual corresponde al valor de HA.



Imagen 72. A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con serina con una concentración total de 200 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa P), la distribución de los elementos es homogénea.

### Serina 500 µg

En la imagen 73, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Ser con una concentración total de 500 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 61.9% para Ca y 38.1% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.62, el cual corresponde al valor de la HA.



**Imagen 73.** *A)* Espectro EDS del cristal de fosfato de calco inducido con Ser con una concentración total de 500 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa *P*), la distribución de los elementos es homogénea

#### Fenilalanina 100 µg

En la imagen 74, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Phe a una concentración total de 100 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 58.9% para Ca y 41.1% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.43, el cual corresponde al valor de whitlockita



**Imagen 74.** *A)* Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con Phe a una concentración total de 100 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. *B)* Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa AI Ca y el color amarillo representa *P*), la distribución de los elementos es homogénea

#### Fenilalanina 200 µg

En la imagen 75, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Phe a una concentración total de 200 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 61.9 % para Ca y 38.1% para P. Al hacer la relación Ca/ P se obtiene con un valor de 1.62, el cual corresponde al valor de la HA.



**Imagen 75.** *A)* Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con Phe a una concentración total de 200 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. *B)* Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa, C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa *P*), la distribución de los elementos es homogénea.

### Fenilalanina 500 µg

En la imagen 76, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Phe a una concentración total de 500 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 61.2 % para Ca y 38.8 % para P. Al hacer la relación Ca/ P se obtiene un valor de 1.57, el cual corresponde al valor de la HA.



**Imagen 76**. A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con Phe a una concentración total de 500 µg. En el recuadro de la imagen A) se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno del os cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color osa representa al Ca y el color amarillo representa P), la distribución de los elementos es homogénea.

### Histidina + Ácido glutámico 100 µg

En la imagen 77, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con His + Glu con una concentración total de 100 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 62.5% para Ca y 37.5% para P.Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.66, el cual corresponde al valor de la HA.



**Imagen 77**.*A*) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con His+ Glu a una concentración de 100 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa P), la distribución de los elementos es homogénea.

# Histidina + Ácido glutámico 200 µg

En la imagen 78, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con His + Glu a una concentración total de 200µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 62.4% para Ca y 37.6% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.65, el cual corresponde al valor de la HA.



Imagen 78. A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con His + Glu a una concentración total de 200 μg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa al P), la distribución de los elementos es homogénea

# Histidina + Ácido glutámico 500 µg

En la imagen 79, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con His + Glu a una concentración total de 500 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 62.5% para Ca y 37.5% para P. Al hacer la relación de Ca/P se obtiene un valor de 1.66, el cual corresponde al valor de la HA



**Imagen 79**. *A)* Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con His+ Glu a una concentración de 500µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa al P), la distribución de los elementos es homogénea.

# Ácido glutámico + Serina 200 µg

En la imagen 80, se presenta en el espectro EDS del cristal inducido con Glu + Ser a una concentración total de 200 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 59.1% para Ca y 40.9 % para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.44, el cual corresponde al valor de whitlockita



Imagen 80. A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con Glu + Ser a una concentración total de 200 µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa al P), la distribución de los elementos es homogénea.

# Ácido glutámico + Serina 500 µg

En la imagen 81, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Glu + Ser a una concentración total de 500 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 62.5% para Ca y 37.5% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.66, el cual corresponde al valor de la HA.



Imagen 81. A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con Glu + Ser a una concentración de 500 μg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa Ca y el color amarillo representa al P), la distribución de los elementos es homogénea

### Fenilalanina + Serina 500 µg

En la imagen 82, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Phe + Ser 500  $\mu$ g a una concentración total de 500  $\mu$ g. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 64.7% para Ca y 35.3% para P. Al hacer la relación de Ca / P se obtiene un valor de 1.83, el cual corresponde al valor de HA.



Imagen 82.A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con Phe + Ser a una concentración de 500 μg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa al P), la distribución de los elementos es homogénea

#### Histidina + Serina 500 µg

En la imagen 83, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con His + Ser a una concentración total de 500 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 61.8 % para Ca y 38.2% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.61, el cual corresponde al valor de la HA.



Imagen 83. A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con His + Ser a una concentración total de 500 μg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa al P), la distribución de los elementos es homogénea

# Ácido glutámico + Fenilalanina 500 µg

En la imagen 84, se presenta el espectro EDS del cristal inducido con Glu + Phe a una concentración total de 500 µg. Se observan picos mayoritarios para Ca y P con un porcentaje atómico de 61.4% para Ca y 38.6% para P. Al hacer la relación Ca/P se obtiene un valor de 1.59, el cual corresponde al valor de la HA.



Imagen 84. A) Espectro EDS del cristal de fosfato de calcio inducido con ácido glutámico + fenilalanina a una concentración total de 500µg. En el recuadro de la imagen A) Se presenta el porcentaje atómico de los elementos constitutivos del cristal. B) Se presenta la zona de la toma del espectro EDS, que corresponde con la superficie de uno de los cristales de estructura mineral tipo drusa. C) Mapeo de los elementos constitutivos del cristal (el color rosa representa al Ca y el color amarillo representa al P), la distribución de los elementos es homogénea.

En la **tabla 6**, se presentan los valores de la relación Ca / P y la fase mineral de los cristales formados en el sistema de contradifusión y que fueron inducidos con los diferentes AA.

Aminoácidos en µg	Relación Ca/ P	Fase mineral
Fenilalanina + Serina 500 µg	64.7/35.3	1.83 Hidroxiapatita
Acido aspártico 100 µg	62.8/37.2	1.68 Hidroxiapatita
Ácido aspártico 200 µg	62.7/37.3	1.68 Hidroxiapatita
Ácido aspártico 500 µg	62.5/37.5	1.66 Hidroxiapatita
Histidina + Ácido glutámico 100 µg	62.5/37.5	1.66 Hidroxiapatita
Histidina + Ácido glutámico 500 µg	62.5/37.5	1.66 Hidroxiapatita
Ácido glutámico + Serina 500 μg	62.5/37.5	1.66 Hidroxiapatita
Histidina + Ácido glutámico 200 µg	62.4/37.6	1.65 Hidroxiapatita
Ácido glutámico 200 μg	62.2/37.8	1.64 Hidroxiapatita
Serina 200 µg	61.9/38.1	1.62 Hidroxiapatita
Serina 500 µg	61.9/38.1	1.62 Hidroxiapatita
Fenilalanina 200 µg	61.9/38.1	1.62 Hidroxiapatita
Arginina 200 μg	61.6/38.2	1.61 Hidroxiapatita
Arginina 500 μg	61.7/38.3	1.61 Hidroxiapatita
Histidina + Serina 500 µg	61.8/38.2	1.61 Hidroxiapatita
Acido glutámico 500 µg	61.6/38.4	1.60 Hidroxiapatita
Histidina 200 µg	61.6/38.4	1.60 Hidroxiapatita
Ácido glutámico + Fenilalanina 500 µg	61.4/38.6	1.59 Hidroxiapatita
Histidina 100 µg	61.8/39.2	1.57 Hidroxiapatita
Fenilalanina 500 µg	61.2/38.8	1.57 Hidroxiapatita
Ácido glutámico 100 µg	59.6/40.4	1.47 Whitlockita
Ácido glutámico + Serina 200 μg	59.1/40.9	1.44 Whitlockita
Serina 100 µg	59.0/41.0	1.43 Whitlockita
Fenilalanina 100 µg	58.9/41.1	1.43 Whitlockita
Histidina 500 µg	56.3/43.7	1.28 Fosfato octacalcico
Prueba control	58.8/46.2	1.16 Brushita

Tabla 6. Se presenta los valores de referencia de las relaciones Ca/P para los cristales inducidos en nuestro estudio, las cuales muestran en su mayoría una fase mineral alta de HA a excepción de Glu 100 μg, Glu + Ser 200 μg, Ser 100μg, Phe 100 μg con un porcentaje correspondiente a Whitlockita; así como His a una concentración de 500 μg encontrada en una fase de fosfato octacalcico. La prueba control presenta la fase menos mineralizada de todos los cristales (brushita), lo que demuestra la importancia de los AA en la inducción y maduración de la fase mineral hacia HA.
### DISCUSIÓN.

Actualmente, son limitado los estudios realizados sobre la función que tienen los AA aislados durante el proceso de biomineralización en hueso, dentina, esmalte y cemento, ya que la mayoría de las investigaciones sobre este proceso se centran en el uso de PCN como la osteopontina, sialoproteína ósea II, fosfoglicoproteína de la matriz extracelular, proteína de la matriz extracelular, proteína 1 de la matriz dentinaria, proteína del cemento 1 y la proteína de adhesión del cemento radicular HACD1/CAP; y diversos péptidos (entre otros). Estas moléculas se caracterizan por poseer cadenas laterales ricas en secuencias de AA de carga negativa (ácidos), lo cual se ha asociado con la propiedad de nucleación y formación de cristales de HA. (10,14,23,44,45,46)

En la tabla 7, se desglosa la composición general de AA de diversas proteínas que participan durante el proceso de biomineralización; en el cual, se analiza la constitución total de AA de cada proteína, el tipo de carga predominante (ácida o básica),así como el AA de mayor predominio de acuerdo con la cantidad/porcentaje de cada proteína. Mediante el análisis de la secuencia primaria de estas proteínas se puede establecer si es que están relacionadas con el proceso de mineralización (principalmente en la nucleación y regulación de cristales de fosfato de calcio), así como identificar las regiones enriquecidas en AA ácidos y que pueden dirigir de forma específica este proceso.

Como se observa en la tabla 7, la mayoría de estas proteínas son ácidas (osteopontina, sialoproteína ósea II, proteína de la matriz dentinaria), o tienen regiones enriquecidas en estos AA, así como regiones ricas en serina como la proteína del cemento 1 y la proteína de la matriz dentinaria. Con esto podemos visualizar la importancia que tienen los AA ácidos en la función biológica asociada a la formación de estructuras mineralizadas y que es relevante profundizar si se pueden usar de forma individual (sin estar unidos en regiones peptídicas) para promover la formación de cristales de HA *in vitro* y posteriormente su uso *in vivo*.

Proteína	Número de Aminoácidos	Número total de residuos con carga (-) / carga (+)	Principales aminoácidos en proporción		
			Aminoacido	Cantidad	70
		(-) Acido aspartico +	Acido	48	5.3%
		Acido glutámico =75	aspártico		
Osteopontina	314		Serina	42	13.4%
		(+) Arginina + Lisina =29	Acido	27	8.6%
			glutámico		
		(-) Ácido aspártico +	Ácido	60	18.9%
		Ácido glutámico: 77	glutámico		
Sialoproteína	317		Glicina	36	11.4%
ósea II		(+) Arginina + Lisina: 24	Treonina	30	30.5 %
		(-) Ácido aspártico +	Serina	57	10.9 %
Fosfoglico	525	Ácido glutámico: 76			
proteína de la			Lisina	50	9.5%
matriz		(+) Arginina + Lisina: 80			
extracelular			Glicina	47	9.0%
		(-) Ácido aspártico +	Serina	110	21.4%
		Ácido glutámico: 142			
Proteína de la	513		Ácido	77	15.0%
matriz		(+) Arginina + Lisina: 41	glutámico		
dentinaria			Ū.		
			Ácido	65	12.5%
			aspártico		
		(-) Ácido Aspártico +	Prolina	28	11.3%
		Ácido glutámico: 14		-	-
CEMP-1	247	g	Glicina	26	10.5%
		(+) Arginina + Lisina <sup>,</sup> 26	Chonica	20	10.070
			Alanina	25	10.5%
		() Ácido conórtico +	Alanina	20	15%
		(-) Acido alutámico: 12	Glicipa	∠ I 14	10%
	140		Gilcina	14	0.20/
HACD1/CAP	140		Leucina	13	9.3%
		(+) Arginina+ Lisina: 13	Serina	12	8.6%

Tabla 7. Composición estructural general de diversas proteínas que participanen el proceso de biomineralización.

En este sentido, los resultados de nuestra investigación aportan datos novedosos sobre la participación de diversos AA (Arg, His ,Asp, Glu, Phe y Ser) y en combinación (Phe + Ser, His + Ser, His + Glu, Glu + Ser) en cuanto a la formación de cristales de fosfatos de calcio. A partir del sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato demostramos el potencial de estos AA en la formación de cristales de HA.

En diversos trabajos publicados se ha mencionado la obtención de cristales de HA a partir de sistemas de contradifusión libre de células en gel de silicato, con el empleo de proteínas como DMP1, CEMP-1 y HACD1(27,44,45,46). De forma específica, en el trabajo de Sivacumar, Gajjeraman y Karthikeyan Narayana, emplearon el sistema de contradifusión libre de células y confirmaron que la proteína de la matriz de dentina (DMP1) induce la formación de cristales de HA. Estos autores reportan que específicamente de los extremos N y C de la DMP1 poseen secuencias enriquecidas en AA ácidos (Glu, Asp) y de Ser, y que probablemente estos son los que dirigen el crecimiento de los cristales de HA (47,48). Sus hallazgos coinciden con nuestros resultados experimentales, ya que hemos demostrado que los AA, en forma aislada poseen propiedades similares a las de una proteína durante el proceso de biomineralización, pero de manera más eficiente, práctica y accesible. A diferencia de los procedimientos más complejos, como lo es la producción de proteínas recombinantes más complejos, como lo es la producción de proteínas recombinantes o la obtención de proteínas nativas donde se requiere la síntesis, extracción y purificación de estas, el uso de AA individuales simplifica este proceso por lo que minimiza tanto el costo y tiempo necesario para llevar a cabo los experimentos necesarios, lo que lo convierte en una alternativa viable y prometedora para estudios en experimentos futuros de biomineralización.

Adicionalmente, Sivacumar Gajjeraman y Karthikeyan Narayana describen que el sistema de contradifusión es un mecanismo óptimo para investigar la nucleación y formación de cristales de fosfato de calcio por parte de proteínas que se cree que pueden participar en el proceso de biomineralización, debido a su estabilidad, con trol, imitación, manipulación y transparencia del sistema. (47) En comparación con este estudio nuestro sistema mostro tener las mismas características y resultados en la nucleación y formación de cristales de HA(cristales esferoidales tipo drusa que emergen del núcleo con el empleo de AA: Glu, Asp, Arg, His, Phe y Ser) y AA en combinación (Phe + Ser, His + Ser, Glu + Ser, His + Glu, Glu + Phe).

En cuanto a la descripción estructural de los cristales formados en el sistema de contradifusión, la herramienta más empleada ha sido la visualización y análisis mediante microscopia electrónica de barrido (SEM). En el estudio realizado por Takuya Matsumoto y Masayuki Okazaki, se empleó Asp como inductor de cristales de fosfato de calcio. Mediante microfotografías SEM se describe que los cristales obtenidos de la prueba control (sin el uso del AA) son cristales planos e irregulares, mientras que con el empleo del AA (100 µg/mL, 200 µg/mL y 500 µg/mL) se forman cristales con orientación definida, de forma alargada y paralela a lo largo del eje cristalino (49)

Con la finalidad de tener un comparativo entre las características estructurales de los diversos cristales de fosfato de calcio inducidos con diferentes proteínas, péptidos y aminoácidos obtenidos de sistemas de contradifusión (27,46,51) y con los cristales que se formaron en nuestro estudio (aislados y en combinación) elaboramos la **tabla 8**. Es interesante que, en la mayoría de los reportes consultados, se describen estructuras esferoidales tipo drusas, sin embargo, en tales estudios se carece a detalle de una descripción microestructural en cuanto a la terminación de los cristales, mientras que nuestros resultados, los cristales mostraron mayoritariamente una terminación cuadrada o desdentada con variaciones en lo ancho.

	Otros estudios		Fuente propia		
Proteína	Estructura/	Terminación	Estructura/	Terminación	
/Aminoácidos	Diámetro		Diámetro		
DMP-1	Esferoidal	Sin datos			
	(47)				
Osteopontina	Esferoidal	Sin datos			
	(51)				
Proteína	Esferoidal	Flecha			
hrCEMP1	130-150 µm	(27)			
	(27)				
Proteína	Esferoidal/	Desdentada			
hrHACD1/CAP	400 µm (46)	(46)			
Ácido	Esferoidal/	Cuadrada	Esferoidal/	oidal/ Punta fina	
glutámico +	200 µm	(50)	402 µm		
Fenilalanina	(50)				
Ácido	Esferoidal	Desdentada	Esferoidal/ Cuadrado		
aspártico	(49)	(49)	1.37 µm		
Ácido	Esferoidal	Desdentada	Esferoidal/		
glutámico	(50)	(50)	260 µm x 327 Flecha		
			μm		
Serina	Esferoidal	Cuadrada	Esferoidal/339	Desdentada	
	(49)	(49)	µm x 337 µm		
	Esferoidal	Desdentada/	Esferoidal/		
Fenilalanina	(50) Cuadrado 338 µm x 329 Cuadrado				
		(50)	μm		
	Esferoidal		Esferoidal/195		
Arginina	(51)	Sin dato	µm x 274 µm	Desdentada	

Tabla 8. Comparación microestructural de diversos trabajos realizados decristales de fosfato de calcio con el uso del sistema de contradifusión libre decélulas con el uso de proteinas, péptidos y aminoácidos, y los resultados denuestro trabajo.

En cuanto al análisis de la composición química y fase mineralizada de los cristales inducidos con proteínas, péptidos y aminoácidos, las herramientas más

utilizadas han sido el análisis elemental EDS, la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT/IR) y microscopia electrónica de transmisión de alta resolución (hrTEM) (27,46). En El caso del FT/IR, proporciona gran precisión para asignar la fase mineralizada del cristal al igual que el análisis por hrTEM, mientras que el uso del EDS se caracteriza por su precisión y distribución de análisis elemental en una región específica del cristal (27,46,50)

Con el uso de estas herramientas, se realizó la comparativa de diferentes estudios con el uso de osteopontina, hrCEMP-1, hrHACD1/CAP, Asp, Glu, Ser, Phe y Arg, con respecto a nuestros resultados en la **tabla 9** 

	Otras fuentes	Fuente propia	
Proteína	Fase mineral mediante	Fase mineral mediante	
	FT/IR/EDS	FT/IR/EDS	
Osteopontina	Sin datos		
Proteína hrCEMP-1	EDS		
	Fosfato octacálcico (27)		
Proteína	EDS		
hrHACD1/CAP	Fosfato octacálcico(46)		
Ácido aspártico	FT/IR	FT/IR / EDS	
	Hidroxiapatita}	Hidroxiapatita	
	(49)		
Ácido glutámico	FT/IR	FT/IR / EDS	
	Hidroxiapatita	Hidroxiapatita	
	(49)		
Serina	FT/IR	FT/IR / EDS	
	Hidroxiapatita	Hidroxiapatita	
	(49)		
Fenilalanina	Sin dato	FT/IR / EDS	
		Hidroxiapatita	
Arginina	EDS	FT/IR / EDS	
	Hidroxiapatita	Hidroxiapatita	
	(52)		

Tabla 9. Análisis comparativos de diversos trabajos de cristales de HA con eluso de herramientas de EDS y FT/IR, y nuestro trabajo.

De acuerdo con los resultados de este proyecto y con investigaciones recientes de Tavafoghi M. y Cerruti M, con el uso de AA de forma aislada *in vitro* como inductores de la biomineralización, demostraron que según la carga de AA se puede conseguir la inhibición o la inducción de cristales de HA y que en general estos poseen un tamaño menor al que se forma con el uso de proteínas (52). Estos datos concuerdan con nuestros resultados experimentales, y de forma interesante los AA que utilizamos en nuestro trabajo solo mostraron función en cuanto a la promoción de los cristales de HA y ninguno inhibió el proceso de mineralización.

#### PERSPECTIVAS.

Los resultados obtenidos en este estudio, junto con el análisis realizado, se sugiere investigar y experimentar con diferentes AA aislados que muestran un mayor predominio en cada proteína, como glicina, treonina, alanina y otros AA que se destacan por su abundancia en términos de cantidad y porcentaje en proteínas. Estos AA, al ser de mayor predominio en las proteínas que participan en la bimineralización, podrían proporcionar nuevas o mismos resultados como las que se obtuvieron en este proyecto.

Los AA utilizados en este proyecto, como Ser, Phe, Glu y Asp, serían de gran interés ser probados en andamios biomateriales, con el fin de evaluar su capacidad de inducir la formación de cristales y su interacción biomineral, lo cual podría abrir oportunidades para su aplicación en estudios *in vivo*, permitiendo explorar su viabilidad futura en posibles organismos vivos.

Asimismo, sería de gran interés realizar estudios donde estos AA se utilicen también con células, para promover la formación de matrices extracelulares y analizar su efecto de mineralización. Estas investigaciones podrían ofrecer alternativas potencialmente prometedoras para el desarrollo de tratamientos de patologías y de reparación de tejidos mineralizados.

# CONCLUSIÓN

Las secuencias ácidas de proteinas no colágenas que participan en el proceso de biomineralización han sido estudiadas durante años debido a su incertidumbre en la interacción que tienen los aminoácidos durante la formación de los cristales de hidroxiapatita. Por lo que, en este estudio se demostró que ciertos aminoácidos, solos o en combinación con diferente carga, promueven la formación de cristales de hidroxiapatita (mediante un sistema de contradifusión en gel) lo que sugiere que durante el proceso de mineralización, los aminoácidos solos de diferente carga como Glu, His, Arg, Asp, Phe y Ser sin la necesidad de interactuar con otros aminoácidos pueden promover la nucleación, conformación y crecimiento de hidroxiapatita en varios sitios de unión con Ca y P, las cuales presentan una estructura tridimensional mineralizada, que en algunos casos, estas se encuentran con presencia de cierta flexibilidad en las prolongaciones de los cristales inducidos con Phe e His de forma aislada, así como en combinación de Phe + Ser e His + Glu.

Este trabajo abre nuevas puertas a investigaciones adicionales encaminadas a profundizar en el papel de los aminoácidos específicos que promueven la formación de cristales de hidroxiapatita; esto puede generar (en un futuro mediato) terapias encaminadas al desarrollo de tejidos mineralizados.

### REFERENCIAS

1. Hołubowicz R, Porębska A, Poznar M, Różycka M, Dobryszycki P. [Biomineralization--precision of shape, structure and properties controlled by proteins]. Postepy Biochemii. 2015;61(4):364-380. PMID: 27048091

2. Moradian-Oldak J, George A. Biomineralization of Enamel and Dentin Mediated by Matrix Proteins. Journal of Dental Research. 2021;100(10):1020-1029. doi:10.1177/00220345211018405

3. Boskey AL, Villarreal-Ramirez E. Intrinsically disordered proteins and biomineralization. Matrix Biol. 2016 May-Jul;52-54:43-59. doi: 10.1016/j.matbio.2016.01.007. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26807759; PMCID: PMC4875856.

4. Henry JP, Bordoni B. Histology, Osteoblasts. [Updated 2023 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan. Available from: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557792/</u>

5. olb AD, Bussard KM. La matriz extracelular ósea como medio ideal para las metástasis de células cancerosas. Cánceres. 2019; 11(7):1020. <u>https://doi.org/10.3390/cancers11071020</u>

6.- Feng, X., & McDonald, J. M. (2011). Disorders of bone remodeling. Annual review of pathology, 6, 121–145. <u>https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130203</u>

7.- Henry, J. P., & Bordoni, B. (2023). Histology, Osteoblasts. In StatPearls. StatPearls Publishing. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491724/

8.- Guibert, C., & Landoulsi, J. (2021). Enzymatic Approach in Calcium Phosphate Biomineralization: A Contribution to Reconcile the Physicochemical with the Physiological View. International journal of molecular sciences, 22(23), 12957. <u>https://doi.org/10.3390/ijms222312957</u>

111

9..- Wright, P. E., & Dyson, H. J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: reassessing the protein structure-function paradigm. Journal of molecular biology, 293(2), 321–331. <u>https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3110</u>

10.- Ricard-Blum S. (2011). The collagen family. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 3(1), a004978. <u>https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978</u>

11- Arai K, Murata S, Wang T, Yoshimura W, Oda-Tokuhisa M, Matsunaga T, Kisailus D, Arakaki A. Adsorption of Biomineralization Protein Mms6 on Magnetite (Fe3O4) Nanoparticles. International Journal of Molecular Sciences. 2022; 23(10):5554. <u>https://doi.org/10.3390/ijms23105554</u>

12.- Gericke, A., Qin, C., Spevak, L., Fujimoto, Y., Butler, W. T., Sørensen, E. S., & Boskey, A. L. (2005). Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. Calcified tissue international, 77(1), 45–54. <a href="https://doi.org/10.1007/s00223-004-1288-1">https://doi.org/10.1007/s00223-004-1288-1</a>

13- Kevin Vincent, Marcus C. Durrant, A structural and functional model for human bone sialoprotein, Journal of Molecular Graphics and Modelling, Volume 39, 2013, Pages 108-117, ISSN 1093-3263, <a href="https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2012.10.007">https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2012.10.007</a>.

14.Uniprot.org

15-Nagasaki, K., Chavez, M. B., Nagasaki, A., Taylor, J. M., Tan, M. H., Ma, M., Ralston, E., Thew, M. E., Kim, D. G., Somerman, M. J., & Foster, B. L. (2022). The Bone Sialoprotein RGD Domain Modulates and Maintains Periodontal Development. Journal of dental research, 101(10), 1238–1247. https://doi.org/10.1177/00220345221100794

16.- Ao, M., Chavez, M. B., Chu, E. Y., Hemstreet, K. C., Yin, Y., Yadav, M. C., Millán, J. L., Fisher, L. W., Goldberg, H. A., Somerman, M. J., & Foster, B. L. (2017). Overlapping functions of bone sialoprotein and pyrophosphate regulators

## in directing cementogenesis. Bone, 105, 134–147. https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.08.027

17-Boskey, A. L., Chiang, P., Fermanis, A., Brown, J., Taleb, H., David, V., & Rowe, P. S. (2010). MEPE's diverse effects on mineralization. Calcified tissue international, 86(1), 42–46. <u>https://doi.org/10.1007/s00223-009-9313-z</u>

18. Yamakoshi Y. Dentin Sialophophoprotein (DSPP) and Dentin. J Oral Biosci. 2008;50(1):33-44. doi:10.2330/joralbiosci.50.33

19. David V, Martin A, Hedge AM, Rowe PS. Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is a new bone renal hormone and vascularization modulator. Endocrinology. 2009;150(9):4012-4023. doi:10.1210/en.2009-0216

20.MATRIX, EXTRACELLULAR, PHOSPHOGLYCOPROTEIN; MEPE - OMIM [Internet]. Omim.org. [citado el 1 de mayo de 2024]. Disponible en: <u>https://www.omim.org/entry/605912</u>

21.- Gao, J., & Xu, D. (2012). Correlation between posttranslational modification and intrinsic disorder in protein. Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing, 94–103

22.- Turan S, Aydin C, Bereket A, et al. Identification of a novel dentin matrix protein-1 (DMP-1) mutation and dental anomalies in a kindred with autosomal recessive hypophosphatemia. Bone. 2010;46(2):402-409. doi:10.1016/j.bone.2009.09.016

23-Correa, R., Arenas, J., Montoya, G., Hoz, L., López, S., Salgado, F., Arroyo, R., Salmerón, N., Romo, E., Zeichner-David, M y Arzate, H. (2019), El péptido derivado de la proteína 1 del cemento sintético regula la mineralización *in vitro* y promueve la regeneración ósea *in vivo*. La Revista FASEB, 33: 1167-1178. https://doi.org/10.1096/fj.201800434RR 24- Montoya G, Correa R, Arenas J, et al. Cementum protein 1-derived peptide (CEMP 1-p1) modulates hydroxyapatite crystal formation *in vitro*. J Pept Sci. 2019;25(10):e3211. doi:10.1002/psc.3211

25- Bermúdez M, Imaz-Rosshandler I, Rangel-Escareño C, Zeichner-David M, Arzate H, Mercado-Celis GE. CEMP1 Induces Transformation in Human Gingival Fibroblasts. PLoS One. 2015;10(5):e0127286. Published 2015 May 26. doi:10.1371/journal.pone.0127286

26-Xiaofeng Chen, Yu Liu, Jie Yang, Wenlei Wu, Leiying Miao, Yijun Yu, Xuebin Yang, Weibin Sun, The synthesis of hydroxyapatite with different crystallinities by controlling the concentration of recombinant CEMP1 for biological application, Materials Science and Engineering: C, Volume 59, 2016, Pages 384-389, ISSN 0928-4931, <u>https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.029</u>.

27-Romo-Arevalo, E.(2014) Caracterización estructural de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y su relación con la función biologica.México:UNAM

28-Montoya, G., Correa, R., Arenas, J., Hoz, L., Romo, E., Arroyo, R., Arzate, H. (2019). El péptido derivado de la proteína 1 del cemento (CEMP 1-p1) modula la formación de cristales de hidroxiapatita in vitro. Revista de ciencia de péptidos. doi:10.1002/psc.3211

29-Rosset EM, Bradshaw AD. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. Matrix Biol. 2016;52-54:78-87. doi:10.1016/j.matbio.2016.02.001

30-Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. J Clin Invest. 2001;107(9):1049-1054. doi:10.1172/JCI12939

31-Jiang S, Sun H-F, Li S, Zhang N, Chen J-S, Liu J-X. SPARC: a potential target for functional nanomaterials and drugs. Front Mol Biosci [Internet]. 2023;10. Disponible en: <u>http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2023.1235428</u>

32-Zhu YS, Mo TT, Jiang C, Zhang JN. Osteonectin bidirectionally regulates osteoblast mineralization. J Orthop Surg Res. 2023;18(1):761. Published 2023 Oct 8. doi:10.1186/s13018-023-04250-1

33- Entry - \*300391 - AMELOGENIN; AMELX - OMIM [Internet]. Omim.org. [citado el 1 de mayo de 2024]. Disponible en: <u>https://www.omim.org/entry/300391</u>

34-Tremillo-Maldonado Omar, Molina-Frechero Nelly, González-González Rogelio, Bologna-Molina Ronell. Alteración del gen AMELX en amelogénesis imperfecta. Una breve revisión. Gac. Méd. Méx [revista en la Internet]. 2019 Feb [citado 2024 Mayo 01] ; 155( 1 ): 101-107. Disponible en: <u>http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0016-38132019000100101&lng=es</u>.

35-Shaw WJ, Tarasevich BJ, Buchko GW, Arachchige RMJ, Burton SD. Controls of nature: Secondary, tertiary, and quaternary structure of the enamel protein amelogenin in solution and on hydroxyapatite. J Struct Biol. 2020;212(3):107630. doi:10.1016/j.jsb.2020.107630

36-Noriharu Sato, Yukiko Takahashi, Shigetaka Asano, Preferential Usage of the Bone-Type Leader Sequence for the Transcripts of Liver/Bone/Kidney-Type Alkaline Phosphatase Gene in Neutrophilic Granulocytes, Blood, Volume 83, Issue 4, 1994, Pages 1093-1101, ISSN 0006-4971, https://doi.org/10.1182/blood.V83.4.1093.1093.

37-Craig Munns, David Sillence, Chapter 156 - Osteogenesis Imperfecta (and Other Disorders of Bone Matrix), Editor(s): David Rimoin, Reed Pyeritz, Bruce Korf, Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics (Sixth Edition), Academic Press, 2013, Pages 1-26, ISBN 9780123838346, <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383834-6.00163-4</u>.

38-Marco A.R. Andrade, Rafael Derradi, Ana M.S. Simão, José Luis Millán, Ana P. Ramos, Pietro Ciancaglini, Maytê Bolean, Is alkaline phosphatase biomimeticaly immobilized on titanium able to propagate the biomineralization

process?, Archives of Biochemistry and Biophysics, Volume 663, 2019, Pages 192-198, ISSN 0003-9861, <u>https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.01.014</u>.

39-Sultana S, Al-Shawafi HA, Makita S, et al. An asparagine at position 417 of tissue-nonspecific alkaline phosphatase is essential for its structure and function as revealed by analysis of the N417S mutation associated with severe hypophosphatasia. Mol Genet Metab. 2013;109(3):282-288. doi:10.1016/j.ymgme.2013.04.016

40-Osathanon T, Giachelli CM, Somerman MJ. Immobilization of alkaline phosphatase on microporous nanofibrous fibrin scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2009;30(27):4513-4521. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.05.022

41-Tavafoghi M. y Cerruti M. 2016 El papel de los aminoácidos en la mineralización de hidroxiapatita J. R. Soc. Interfaz. 13 20160462 <u>http://doi.org/10.1098/rsif.2016.0462</u>

42- Campos MN, Giraldo EL, del Rio Portilla F, Fernández-Velasco DA, Arzate H, Romo-Arévalo E. Estructura de RMN en solución del péptido derivado de la proteína 1 del cemento (CEMP1-p1) y su papel en el proceso de mineralización. J. Pept Sci [Internet]. 2023;29(10). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/psc.3494

43- Gajjeraman S, Narayanan K, Hao J, Qin C, George A. Las macromoléculas de la matriz en los tejidos duros controlan la nucleación y el ensamblaje jerárquico de la hidroxiapatita . J Biol Chem . 2007 ; 282 (2): 1193-1204 . doi: 10.1074/jbc.M604732200

44-Zarkov A. Sol-gel technology applied to materials science: Synthesis, characterization and applications. Zarkov A, editor. MDPI; 2024.

45- Dmitry Bokov, Abduladheem Turki Jalil, Supat Chupradit, Wanich Suksatan, Mohammad Javed Ansari, Iman H. Shewael, Gabdrakhman H. Valiev, Ehsan Kianfar, "Nanomaterial por método Sol-Gel: síntesis y aplicación", Avances en ciencia e ingeniería de materiales , vol. 2021, artículo ID 5102014, 21 páginas, 2021. <u>https://doi.org/10.1155/2021/5102014</u>

46-Nidome- Campos, M. (2018). Estudio de plegamiento y estabilidad estructural de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP). México: UNAM

47-Gajjeraman S, Narayanan K, Hao J, Qin C, George A. Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *J Biol Chem.* 2007;282(2):1193-1204. doi:10.1074/jbc.M604732200

48- Tartaix PH, Doulaverakis M, George A, et al. In vitro effects of dentin matrix protein-1 on hydroxyapatite formation provide insights into in vivo functions. *J Biol Chem.* 2004;279(18):18115-18120. doi:10.1074/jbc.M314114200

49- Matsumoto T, Okazaki M, Inoue M, Sasaki J, Hamada Y, Takahashi J. Role of acidic amino acid for regulating hydroxyapatite crystal growth. *Dent Mater J*. 2006;25(2):360-364. doi:10.4012/dmj.25.360

50-Scherling Ocampo, A. Andamios funcionalizados con aminoácidos como medios inductores de la regeneración ósea. México: UNAM

51-Duman E, Şahin Kehribar E, Ahan RE, Yuca E, Şeker UÖŞ. Biomineralization of Calcium Phosphate Crystals Controlled by Protein-Protein Interactions. *ACS Biomater Sci Eng.* 2019;5(9):4750-4763. doi:10.1021/acsbiomaterials.9b00649

52-Tavafoghi M.,Brodusch N., Gauvin R.y Cerruti M.2016.Hydroxyapatite formation on Graphene oxide modified with amino acids:arginine versus glutamic acid J.R.Soc.Interface.13:20150986.Doi: https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0986