



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE MEDICINA

ESPECIALIDAD DE PROSTODONCIA



**“ANÁLISIS MICROSCÓPICO Y ESPECTROSCÓPICO DE UNA
HIDROXIAPATITA COMERCIAL AL SER COMBINADA CON UN PÉPTIDO
DERIVADO DE LA PROTEÍNA DEL CEMENTO (pCEMP1) EMPLEANDO EL
MÉTODO DE SÍNTESIS GELCASTING”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de la

ESPECIALIDAD EN PROSTODONCIA

Presenta:

L.O. SAHID ASIR ABÚNDEZ CARRAZCO

Director del proyecto:

Dr. en C. RODRIGO CORREA PRADO

OCTUBRE 2023

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

RESUMEN.

Introducción: los péptidos derivados de las proteínas del cemento han demostrado desencadenar osteogénesis y osteoregeneración. Sin embargo, en la actualidad no existe información sobre los cambios morfológicos que produce pCEMP1 en los cristales de hidroxiapatita (HAp) sintetizada por el método de gelcasting modificado que permitan desarrollar un nuevo biomaterial con características prometedoras, para su aplicación *in vivo*.

Objetivo: determinar si existen cambios químicos y estructurales de la HAp al combinarla con pCEMP1, por el método de gelcasting modificado.

Material y métodos: por medio de un estudio experimental *in vitro*, se sintetizaron 5 muestras de HAp combinada con pCEMP1 utilizando el método de gelcasting modificado las cuales fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), Fluorescencia de rayos X (XRF), difracción de rayos X (XRD), espectroscopía Raman y microscopía infrarroja por reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

Resultados: en las imágenes SEM mostraron tamaños de poro promedio de entre 20-40 μm y de 100-150 μm . El análisis EDS mostró cambios en la relación Calcio Fósforo de 1.63 en el grupo control a 1.77 en el grupo con péptido, por medio del análisis FTIR-ATR se aprecian bandas en 2924 cm^{-1} correspondientes al grupo Amida B (C-H), en 1639 cm^{-1} del grupo Amida I (C=O), Amida II (N-H y C-H) en las bandas 1550 , 1532 y 1519 cm^{-1} así como los grupos fosfato e hidroxilo correspondientes a la HAp, el análisis de los espectros Raman con pCEMP-1 se distingue un incremento en la banda 595 cm^{-1} y la aparición de una banda en 390 cm^{-1} asociada a pCEMP-1 .

Conclusiones: el método de gelcasting modificado permitió controlar la porosidad en los andamios de HAp, pCEMP1 induce cambios morfológicos en las muestras de HAp, con un crecimiento preferencial en el plano C, estos cambios muestran una estructura similar al hueso trabecular con apariencia más compacta y organizada al compararlos con los grupos control. Así mismo existe un cambio en la relación Ca/P, en base a los análisis se puede observar una gran afinidad del péptido hacia la HAp esto a pesar del proceso de sinterizado.

Palabras clave: pCEMP1, HAp, gelcasting modificado, osteogénesis, CEMP1

SUMMARY.

Introduction: peptides derived from cement have shown to trigger osteogenesis and osteoregeneration. However, there is currently no information on the morphological changes produced by pCEMP1 in the HAp crystals synthesized by the modified gelcasting method that allow the development of a new biomaterial with promising characteristics, for its application in live.

Objective: determine if there are chemical and structural changes of Hap when combined with pCEMP1, by the modified gelcasting method.

Material and methods: through an in vitro experimental study, 5 samples of HAp combined with pCEMP1 were synthesized using the modified gelcasting technique, which were analyzed by SEM, XRF, XRD, FTIR-ATR.

Results: in the SEM images, average pore sizes between 20-40 μm and 100-150 μm could be seen. The EDS analysis showed changes in the Calcium Phosphorus ratio from 1.63 in the control group to 1.77 in the group with peptide, by means of the FTIR-ATR analysis, bands were observed at 2924 cm^{-1} corresponding to the Amide B (C-H) group, at 1639 cm^{-1} of the group Amide I (C=O), Amide II (N-H and C-H) in the bands 1550, 1532 and 1519 cm^{-1} as well as the phosphate and hydroxyl groups corresponding to HAp, the analysis of the Raman spectra with pCEMP-1 shows an increase in the 595 cm^{-1} band and the appearance of a band at 390 cm^{-1} associated with pCEMP-1.

Conclusions: the modified gelcasting method allowed to control the porosity in the HAp blocks, pCEMP1 produces morphological changes in the HAp samples, apparently with a preference for C-plane growth, these changes show an apparently more compact and organized structure when compared to the control groups. Likewise, there is a change in the Ca/P ratio. Based on the analyses, a great affinity of the peptide towards the HAp molecule can be observed, despite the sintering process.

Keywords: pCEMP1, HAp, Modified Gelcasting, Osteogenesis, CEMP1

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Autónoma de Querétato por brindarme el lugar, las herramientas y doce años de conocimientos, para crecer en todos los ambitos.

Al Posgrado de Prostodoncia, por permitirme cumplir una meta más en mi formación.

Un especial agradecimiento a mi tutor, maestro y amigo el Dr. Rodrigo Correa Prado; por la oportunidad de integrarme a su investigacion, por todo su apoyo, dedicación, paciencia y esmero que me proporciono a lo largo del proyecto, sin usted no hubiera sido posible.

Al Dr. Ruben Domínguez, por su orientación y consejos para la redacción.

Gracias al equipo del Centro de Física Aplicada y Tecnología avanzada UNAM/ Juriquilla, por su tiempo y apoyo para el uso de instalaciones y maquinas empleadas para esta investigación.

Al Dr. Eric Mauricio Rivera Muñoz, por su apoyo y asesoramiento durante el proyecto.

Al Dr. Manuel Aguilar por su apoyo durante el uso del microscopio electrónico de barrido.

Al Maestro Guillermo Vázquez por su apoyo, soporte técnico y de computo que nos proporcionó.

Al Dr. Mario Rodríguez por su apoyo y asesoría en los análisis infrarojos.

A la Dra. Carmen Peza, por su tiempo y asesoría en los análisis de fluorescencia de rayos x.

A la Dra Beatriz Millán por su apoyo en las pruebas y análisis de difraccion de rayos x.

A la Dra. Maria Antonieta Mondragon por su asesoría y apoyo en los análisis Raman.

A mi familia, por su apoyo incondicional durante toda mi vida, les debo todo.

A Viridiana Vega Mireles, por aguantarme todos los días.

ABREVIATURAS.

pCEMP1: Péptido derivado de la proteína del cemento 1.

CEMP1 : Proteína del cemento 1.

HAp: Hidroxiapatita.

SEM: Microscopía electrónica de barrido.

XRD : Difracción de rayos X.

XRF: Fluorescencia de rayos X.

FTIR-ATR: Microscopía infraroja por reflectancia total atenuada.

OCP: Fosfato octacálcico.

OH: Hidroxilo.

PO₄: Fosfato.

ÍNDICE.

PORTADA.....	1
RESUMEN.....	2
SUMMARY.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
ABREVIATURAS.....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	7
II. ANTECEDENTES.....	8
III. HIPÓTESIS.....	11
IV. OBJETIVOS.....	12
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
VIII. CONCLUSIONES.....	27
IX. PROPUESTAS.....	28
X. BIBLIOGRAFÍA.....	29
XI. ANEXOS.....	33

I. Introducción

La enfermedad periodontal es un problema de salud público, fuertemente asociado a enfermedades sistémicas, es una afección inflamatoria grave del periodonto que daña progresivamente el tejido blando y destruye el hueso alveolar que sostiene los dientes. La prevalencia de enfermedad periodontal en México se ha reportado en 70 % para el año 2010 en población general (Chávez, Y. 2021). Las modalidades de tratamiento tradicionales como la instrumentación mecánica, el curetaje y el desbridamiento con colgajo dan como resultado el control de la inflamación y la formación de epitelio de unión, que conduce solo a la reparación periodontal y no a la regeneración (Lenka, B., et al 2020). El uso combinado de andamios, células y moléculas bioactivas como los péptidos se considera el mejor enfoque para lograr la regeneración de tejidos. Específicamente, los péptidos sintéticos presentan características favorables en la biocompatibilidad del andamio ya que en muchos casos pueden imitar la función de un péptido o una proteína nativa. Además, son moléculas bioactivas fáciles de producir, procesar y modificar, y se pueden preparar en condiciones bien definidas y controladas (Bermúdez, M., et al., 2021). El pCEMP1 es un péptido bioactivo derivado de la proteína del cemento 1 (CEMP1), constituido por 13 aminoácidos, se sintetizó en fase sólida Fmoc y fue purificado mediante C-18 cromatografía líquida de fase inversa C, con un >95 % de nivel de pureza y una masa de 1630 Da.

En una reciente investigación los ensayos *in vivo* realizados a través de defectos en calvarias en ratas wistar tratadas con pCEMP1 dieron como resultado la neo formación de un tejido en un 88 % similar hueso posterior a los 30 y 60 días de tratamiento. Estos datos demuestran que pCEMP1 es un péptido bioactivo eficaz para la regeneración del tejido óseo (Correa, R., et al 2019).

El método de gelcasting se basa en la síntesis química de cerámicas y polímeros, presenta varias ventajas: formación de gel más rápida; los moldes pueden estar hechos de una gran variedad de materiales como metales, vidrio, madera y polímeros. El procedimiento de limpieza del molde utilizado no es crítico para producir materiales de alta calidad. La fase cerámica inicial de la HAp permanece prácticamente sin cambios durante el proceso de fundición, permitiendo la producción de un objeto cerámico con una forma predeterminada (Rivera-Muñoz., E., et al 2001). Esto demuestra la viabilidad de la fabricación de objetos cerámicos porosos que comienzan con polvos HAp sin cambiar sus propiedades físicas y químicas. Una mayor porosidad permite una mejor interacción entre el huésped y el injerto, lo que a su vez permite que ocurra la vascularización en un período de tiempo más corto. Al mismo tiempo, se obtiene una distribución más estrecha de tamaños de poro.

En la actualidad se han implementado nuevas estrategias que permitan la remodelación del tejido óseo y que emulen las características biológicas del hueso, por ello se implementa el uso de HAp comercial combinada con pCEMP1 ya que diversos estudios *in vitro e in vivo* han demostrado que es una biomolécula capaz de regular el proceso de mineralización y regeneración ósea. La síntesis de HAp por el método de gel casting es un procedimiento eficaz, rápido y de bajo costo que permite modular parámetros y características de la HAp. Sugerimos que al combinar el péptido con la HAp+pCEMP1 obtenida por el método de gelcasting mejorara las características físicas, químicas y biológicas de las HAp comerciales, obteniendo cristales orientados hacia un plano preferencial y una relación Ca/P cercana al parámetro estequiométrico del tejido óseo y dental.

El objetivo de la presente investigación fue identificar si pCEMP1 produce cambios morfológicos en la HAp comercial, sintetizada por el método gelcasting modificado.

II. Antecedentes

La proteína del cemento 1 (CEMP1) es una proteína termoestable, glicosilada y fosforilada, con un peso de 26 kDa, posee un punto isoeléctrico de 9.73, su estructura secundaria está conformada por 28.6 % alfa hélice, 9.9 % beta plegada y 61.5 % son proteínas intrínsecamente desordenadas. Expresada principalmente en cementoblastos, cementocitos, subpoblaciones celulares del ligamento periodontal, células de la vaina radicular de Hertwig y células de folículo dental. Posee múltiples propiedades para inducir la mineralización, proliferación, diferenciación y maduración celular. Estudios *in vivo* han demostrado que induce la regeneración ósea en defectos en cráneos de ratas Wistar sugiriéndola como mediadora en la curación de heridas y regeneración periodontal, posee propiedades intrínsecas para unirse a la HAp y formar cristales de fosfato octacálcico. El modelado *in silico* de CEMP-1 sugiere que algunas secuencias de péptidos están expuestas en la superficie de la estructura de la proteína plegada, y sería razonable inferir que estos dominios pueden poseer propiedades biológicas propias (Correa., R., et al 2019).

Un péptido puede ser definido como un polímero corto de aminoácidos, en los últimos años la industria farmacéutica ha incrementado su atención en los tratamientos con uso de péptidos, los péptidos creados artificialmente ofrecen muchas ventajas por encima de otras moléculas, tales como mayor afinidad, menor tamaño lo que facilita su penetración en tejidos más profundos, seguros, tolerables, comparados a otros biofármacos a base de proteínas presentan menores costos de producción, menor respuesta inmunológica que las proteínas recombinantes y anticuerpos, muestran mayor actividad por unidad de masa, presentan mayor estabilidad, lo que les permite ser almacenados a temperatura ambiente por mayor tiempo, además los residuos de los péptidos son aminoácidos y debido a su corto periodo de vida, pocos péptidos se acumulan en los tejidos, reduciendo riesgos por toxicidad sistémica y metabolitos (Bermúdez, M., et al 2021).

CAP-pi es un péptido derivado de la proteína de anclaje del cemento que en estudios *in vitro* ha demostrado actividad inhibidora en la nucleación y crecimiento de cristales minerales. CEMP1-p3 es un péptido derivado de la CEMP1, que en estudios *in vitro* ha demostrado inducir la maduración de cristales de fosfato octacálcico a cristales de HAp. CEMP-p4 es un péptido sintético derivado de la CEMP1, que ha demostrado proliferar y diferenciar células madre de la mucosa oral humana a través de la vía Wnt/ β catenina, induciendo la formación de cristales de HAp (Bermúdez, M., et al 2021).

p-CEMP1 es un péptido bioactivo derivado de la CEMP1, constituido por 13 aminoácidos, se sintetizó en fase sólida Fmoc y fue purificado mediante C-18 cromatografía líquida de fase inversa C, con un >95 % de nivel de pureza y una masa de 1630 Da. El péptido fue disuelto y destilado en agua a temperatura ambiente. Las soluciones de los péptidos fueron filtradas y se almacenaron a 4 °C antes de usarlos. Imita las capacidades biológicas y mineralizantes de la proteína CEMP1, se considera un péptido intrínsecamente desordenado, estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado sus propiedades óseoinductivas, las cuales aumentan la formación y maduración de hueso, poseer una alta afinidad por el Ca⁺ y desempeñar un papel importante en regular la formación de cristales de HAp. Por lo tanto, pCEMP1 representa importantes aplicaciones de estudio para tratamientos de trastornos óseos y músculo esqueléticos como pérdidas óseas, fracturas, regeneración de otros tejidos mineralizados

como la dentina y cemento, destruidos por caries dental y enfermedad periodontal (Montoya., G., et al 2019).

En una reciente investigación se muestra que pCEMP1 mejoró significativamente la proliferación y diferenciación de las células del ligamento periodontal humano hacia un fenotipo similar a la mineralización, como lo demuestra el aumento de la actividad de fosfatasa alcalina específica (ALP), factor de transcripción relacionado con RuntX (RUNX) -2, sialoproteína de unión a integrina, proteína morfogenética ósea-2, osteocalcina y expresión de CEMP1 a nivel de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteína. Los ensayos *in vivo* realizados a través de defectos en calvarias en ratas wistar tratadas con pCEMP1 dieron como resultado la neo formación de un tejido en un 88 % similar hueso posterior a los 30 y 60 días de tratamiento. Estos datos demuestran que pCEMP1 es un péptido bioactivo eficaz para la regeneración del tejido óseo (Correa., R., et al 2019).

Los resultados indican que pCEMP1 carece de estructura secundaria, forma nanoesferas que se organizan en estructuras tridimensionales, posee afinidad por la HAp e induce su nucleación. pCEMP1 promueve la formación de estructuras esféricas compuestas por cristales densamente empaquetados, que revelaron una relación Ca / P de 1.56, correspondiente a HAp. La FTIR-ATR mostró grupos funcionales predominantes y característicos de HAp y fosfato octacálcico (OCP). El análisis por XRD indican que los cristales muestran planos con una orientación cristalina preferencial para HAp y para OCP. La microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) mostró distancias que corresponden a planos cristalinos de HAp y OCP. Los cristales están compuestos por láminas superpuestas, que exhiben crecimiento epitaxial, y cada capa de los cristales está estructurada por nanocristales. Este estudio revela que pCEMP1 regula la formación de cristales de HAp, imitando de alguna manera el proceso *in vivo* de la bioformación de tejidos mineralizados (Montoya., G., et al 2019).

El método de gelcasting ha demostrado ser una técnica eficaz en el procesamiento de andamios de HAp, produciendo cuerpos uniformes. La uniformidad microestructural y los valores de microdureza son mejores para las muestras derivadas por medio de esta vía (Varma., H y Sivakumar., R., 1996). Estudios realizados por otros investigadores, obtuvieron cuerpos de HAp bien formados mediante un proceso de fundición en gel (Chen., H., et al 2008). La técnica de fundición en gel es el método que da como resultado la producción de andamios que imitan más estrechamente la estructura del hueso trabecular. Además las suspensiones cerámicas que contienen agentes espumantes y gelificantes conducen a una solidificación rápida, lo que resulta en cuerpos altamente porosos y relativamente fuertes, siendo un material prometedor de sustitución ósea (Potoczek., M., et al 2009). Es posible sintetizar nanocompuestos nanocristalinos de HAp tridimensionales con estructuras de poros controlados mediante la fundición en gel y los compuestos obtenidos poseen propiedades mecánicas similares al hueso esponjoso (Azami., M., et al 2010).

El crecimiento de nanopartículas de HAp en geles de sílice se logró con éxito mediante el uso de diversos aditivos químicos. Durante seis semanas consecutivas estas partículas mostraron una forma regular y un tamaño uniforme cada semana, manteniéndose siempre dentro de la nanoescala. Tanto el tamaño como la morfología de las nanopartículas de HAp obtenidos son afectados por la interfaz de líquido a sólido. Los aditivos químicos utilizados afectan la interfaz sólido a líquido al reducir la energía interfacial y al estabilizar la estructura del gel. Al modificar

la concentración y el tipo de aditivo es posible controlar tanto la morfología como el tamaño de las nanopartículas (Rivera-Muñoz., E., et al 2011). Fue utilizado bicarbonato de sodio como amortiguador de pH y se sintetizaron barras monocristalinas de HAp con un tamaño, dimensiones y direcciones controlables por medio de una vía hidrotermal en un medio ácido-débil, sin utilizar algún surfactante durante el proceso. Estas características morfológicas pueden controlarse mediante el tiempo de reacción hidrotermal y temperatura. Las nanoestructuras obtenidas son de alta homogeneidad y alta pureza sin defectos cristalinos, con un crecimiento cristalino preferencial a lo largo del eje C. Se espera que estas tengan aplicaciones potenciales en odontología, medicina y biocompositos (Ren., F., et al 2012). En un estudio realizado por investigadores del departamento de química aplicada de la universidad nacional de Andong Korea se sintetizó la HAp con aloinjerto de hueso liofilizado. El resultado muestra que la HAp obtenida, es efectiva en la activación de osteoblastos desarrollados en mayor grado y promueve la síntesis ósea. También el producto puede fabricarse en gran cantidad y transformarse en una estructura de andamio que realizará una configuración más fuerte (Kang., H., et al 2013).

El método de gelcasting tiene varias ventajas: formación de gel más rápida; los moldes pueden estar hechos de una gran variedad de materiales como metales, vidrio, madera, polímeros, etc. El procedimiento de limpieza del molde utilizado no es crítico para producir materiales de alta calidad. La fase cerámica inicial de HAp, permanece prácticamente sin cambios durante el proceso de fundición, permitiendo la producción de un objeto cerámico con una forma predeterminada. Esto demuestra la viabilidad de la fabricación de objetos cerámicos porosos que comienzan con polvos HAp sin cambiar sus propiedades físicas y químicas. Una mayor porosidad permite una mejor interacción entre el huésped y el injerto, lo que a su vez permite que ocurra la vascularización en un período de tiempo más corto. Al mismo tiempo, se obtiene una distribución más estrecha de tamaños de poro. Por lo tanto, no hay poros muy grandes, lo que garantiza una menor biodegradabilidad de nuestros materiales. Si bien el método se ha aplicado a las esferas de HAp, claramente se puede aplicar para producir otros materiales con porosidad predefinida. (Rivera-Muñoz., E., et al 2001).

III. Hipótesis

pCEMP1, produce cambios químicos y estructurales en la HAp utilizando el método de gelcasting modificado durante su síntesis.

IV. Objetivos

IV.1 Objetivo general

Determinar si existen cambios químicos y estructurales de la HAp sintetizada por el método de gelcasting modificado al combinarla con pCEMP1.

IV.2 Objetivos específicos

- Sintetizar HAp por el método gelcasting modificado.
- Sintetizar HAp combinada con pCEMP1 por el método gelcasting modificado.
- Analizar por Espectroscopía Infrarroja las características de la HAp, obtenida por el método gelcasting modificado.
- Analizar por Microscopía de Barrido las características ultraestructurales de la HAp, obtenida por el método gelcasting modificado.
- Analizar por Difracción de Rayos X la orientación cristalina preferencial de la HAp, obtenida por el método gelcasting modificado.
- Comparar los resultados obtenidos de forma descriptiva.

V. Material y métodos

V.1 Tipo de investigación

Experimental *in vitro*

V.2 Población o unidad de análisis

HAp + pCEMP1

V.3 Muestra y tipo de muestra

- Muestras de HAp comercial utilizando el método de gelcasting.
- Muestras de HAp modificada con pCEMP1 utilizando el método de gelcasting.

V.3.1 Criterios de selección

HAp comercial sin pCEMP1

V.3.2 Variables estudiadas

- HAP
- pCEMP1

V.4 Técnicas e instrumentos

HAp: Implante osteoconductor derivado de tejido óseo humano, Clase III, producto estéril, libre de pirógenos.

Constituido en un 70% de sales inorgánicas y en un 30% de matriz orgánica. La parte orgánica está conformada en más de 90% por fibras de colágeno. La parte inorgánica está formada por cristales de calcio y fósforo.

Hueso en polvo con un tamaño de partícula de 500 a 800 μm .

pCEMp1: Péptido sintético derivado de la Proteína del Cemento 1.

V.5 Procedimientos

SINTESIS DEL PÉPTIDO.

1. DISEÑO Y PREPARACIÓN DE ANDAMOS POR EL MÉTODO DE GELCASTING MODIFICADO.

- a. Se utilizó Polivinil Butiral como agente aglutinante; manteniéndose en agitación hasta obtener una homogeneidad en la solución
- b. Fue fundido el Polietilen Glicol (Plastificante) en una parrilla y posteriormente se añadió el Ácido Poliacrílico (Dispersante).
- c. Una vez mezclado el Polietilen Glicol Y el Ácido Poliacrílico se mezclaron junto con el Polivinil Butiral.
- d. Se mezcló la HAp+pCEMP1 en el grupo experimental y otro grupo como control solamente la HAp con el Ácido Oxálico.
- e. Por último, se mezcló la solución del paso c con el d hasta obtener una pasta.
- f. La pasta es vaciada a moldes de silicón ya conformados y las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente hasta que se evaporó el etanol.
- g. Las muestras fueron desmoldadas de los moldes de silicón en un tiempo de 24 horas y recolectadas en una caja de Petri.
- h. Se colocaron en crisoles de alúmina e introdujeron en una mufla para calcinarlas; esta fue programada con incrementos de 1 °C/min para eliminar los polímeros por un tiempo de 30 horas hasta llegar a una temperatura de 1100 °C, permaneciendo esta temperatura por un lapso de 2 horas para lograr la sinterización de partículas de HAp, dejando enfriar las muestras hasta temperatura ambiente.
- i. Se calentó la grenetina a 80 ° C, 50 mL de agua.
- j. Se hidrató la grenetina paulatinamente hasta obtener una solución homogénea.
- k. Se agregó por goteo, la solución de grenetina a los andamios de HAp experimental y control y dejar secar a temperatura ambiente

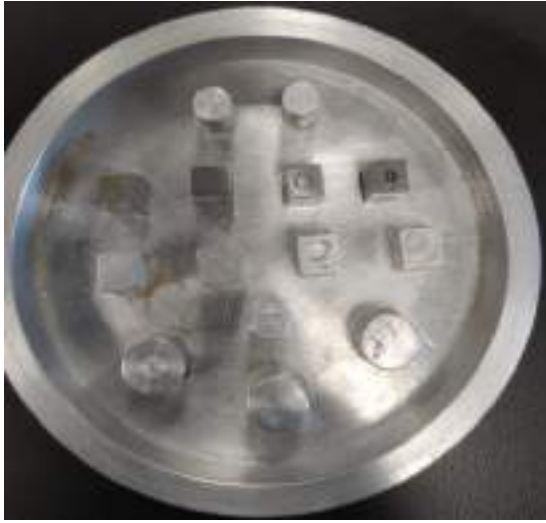


Figura 1 Mufla



Figura 2 Bloques de HAp

2. ANÁLISIS DE LOS ANDAMIOS OBTENIDOS POR LAS TÉCNICAS DE SEM, EDS, FTIR, RAMAN Y XRD.

MICROSCOPIÓ ELECTRÓNICA DE BARRIDO

1. La muestra es colocada en portaobjetos de aluminio y son fijados por medio de cinta carbono.
2. Posterior a esto, las muestras fueron recubiertas con una capa de oro en un equipo Sputter Coater para poder visualizarlas en el microscópio
3. Las muestras fueron llevadas al microscopio electrónico de barrido marca Hitachi modelo SU8230 para el análisis ultraestructural, un voltaje de aceleración a 15 kV mediante electrones secundarios.
4. Por otro lado, el microscópio de barrido esta equipado con un detector marca Bruker XFlash 6/60 con el cual se obtuvo información de la composición química de la muestra con un voltaje de 5.0 keV

DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Este método proporciona información de la estructura cristalina de la muestra analizada, lo que permite conocer si la muestra consta de una fase pura o presencia de fases secundarias.

Las muestra se analizaron mediante XRD mediante polvos para identificar patrones de crecimiento de la HAp, los cuales nos permitiran saber si existe algun cambio cristalino.

1. Las muestras se pulverizaron utilizando un mortero y pistilo hasta homogenizar las partículas de HAp.

2. El polvo fue colocado en un portamuestras Proton Zero Background Holder en un difractómetro modelo miniflex marca Rigaku UIV
3. El análisis de difracción fue operado a 40Kv y 30 mA, a una velocidad de exploración de 2° por segundo en un rango de 2θ de 5° a 80° e incrementos de 0.02° por minuto.
4. La identificación de la fase se realizó utilizando el archivo de datos de archivo de difracción de polvo (PDF) proporcionado por el Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD), que utilizó el software "Materiales de datos Jade" de "MDI Materiales de datos".

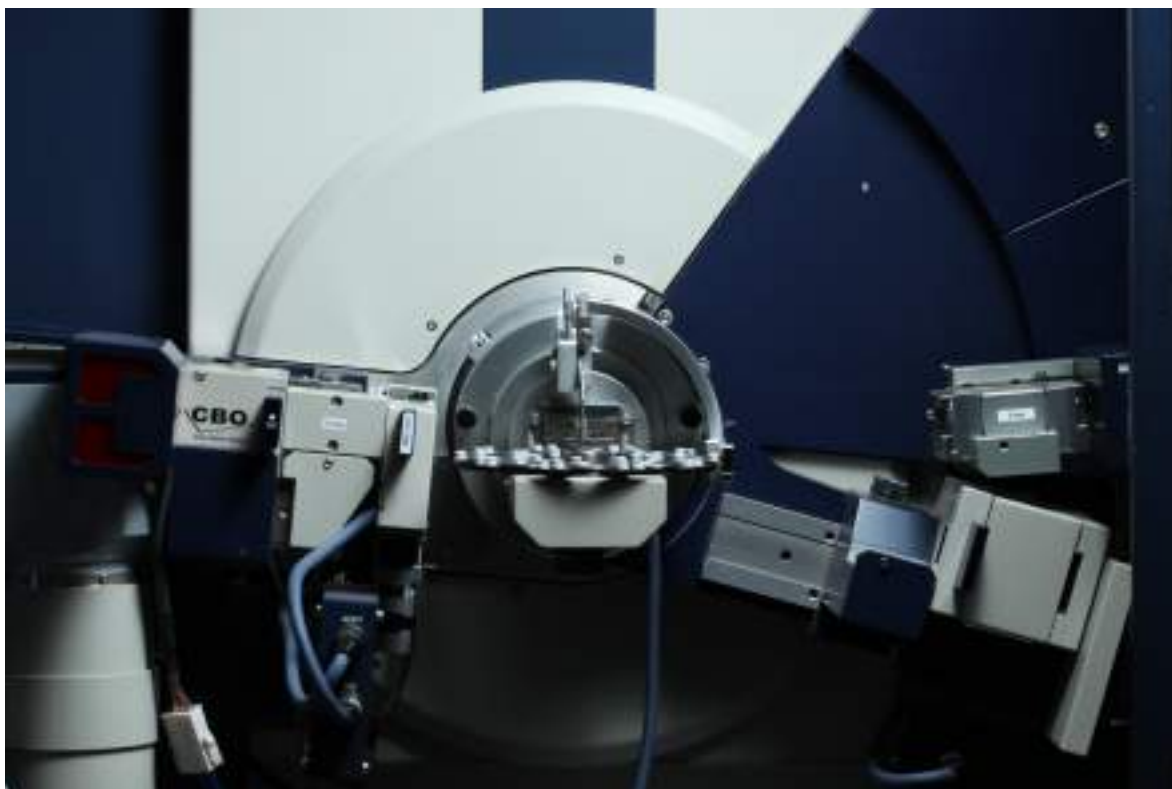


Figura 3 Difractómetro Rigaku UIV modelo miniflex.

MICROSCOPIA RAMAN

La espectroscopía RAMAN es una técnica de análisis molecular, no destructiva, usada para análisis de materiales orgánicos e inorgánicos, ofrece información basada en la vibración de las moléculas de la muestra analizada, sirve para analizar una gran cantidad de compuestos y materiales.

La presencia de grupos fosfato y grupos funcionales en el material obtenido se analizó mediante espectroscopía RAMAN en el Espectrómetro Bruker Senterra, con una longitud de onda de 785 nm y un objetivo de 20x, con un tiempo de adquisición de 8 segundos por cada muestra y 8 repeticiones, la potencia empleada en la superficie de la muestra fue de 25 mW.

1. Las muestras fueron trituradas y pulverizadas de forma homogénea en un mortero de agata.
2. Una pequeña porción del polvo fue colocado en un portaobjetos para su análisis en un Espectrómetro Bruker Senterra, con una longitud de onda de 785 nm y un objetivo de 20x, con un tiempo de adquisición de 8 segundos por cada muestra y 8 repeticiones, la potencia empleada en la superficie de la muestra fue de 25 mW.
3. Las muestras fueron graficadas en el programa Origin Pro 2021.

MICROSCOPIÓ FTIR-ATR

El análisis por FTIR-ATR permite identificar presencia grupos funcionales característicos de material inorgánico y posible material orgánico del pCEMP1. Las muestras obtenidas fueron analizadas en un equipo espectrofotómetro Pekin Elmer utilizando un plato de cristal de diamante/ZnSe. Se realizaron 40 escaneos en cada muestra a una resolución espectral de 5 cm^{-1} en un rango de espectro infrarrojo de 400 a 4000cm^{-1} .

1. Las muestras fueron trituradas y pulverizadas de forma homogénea en un mortero de agata.
2. Una pequeña muestra fue analizada en un espectrofotómetro marca Pekin Elmer utilizando un plato de cristal de diamante/ZnSe. Se realizaron 40 escaneos en cada muestra a una resolución espectral de 5cm^{-1} en un rango de espectro infrarrojo de 400a 4000cm^{-1} .
3. Las muestras fueron graficadas en el programa Origin Pro 2021.



Figura 4 Espectrofotómetro Pekin Elmer serie APWi200342

VI. Resultados y Discusión.

Las muestras fueron analizadas antes y después del proceso de sinterizado mediante SEM con la finalidad de evaluar los cambios morfológicos y macroscópicos que genero la adición del péptido y el método de síntesis gelcastig.

En la figura 5 A y B podemos observar imágenes de SEM antes y después del proceso de sinterizado en los bloques de HAp+PBMA+PEMA. Así como lo describio Rivera-Muñoz., E., et al (2011) el método de gelcasting presentó varias ventajas para la síntesis de HAp, los moldes pudieron ser elaborados de manera sencilla y reutilizados para otras muestras, la HAp inicial permanece estable e invariante durante todo el proceso, la incorporación de esferas de metacrilatos en diferentes diámetros, permitió controlar la porosidad en los bloques de HAp, estas esferas son completamente eliminadas, mediante el proceso de sinterizado.

En la figura 5 C y D Se puede observar la ausencia de la totalidad de esferas de HAp+PBMA+PEMA post-sinterizado, en las cuales se observan porosidades con tamaños promedio de 20-40 μm y de 100-150 μm . Méndez-Lozano., N. (2017) menciona que un andamio sintético de HAp debe de permitir la neoformación de vasos sanguíneos por lo que el tamaño de poros deben de ser mayores a 100 μm y para que promueva la adhesión celular debe de presenta un tamaño de poro inferior a 20 μm . La tabla I (Tripathi., G. 2011) describe las características en cuanto al tamaño de poro y distribución ideal para un injerto empleado en la ingeniería de tejidos óseos.

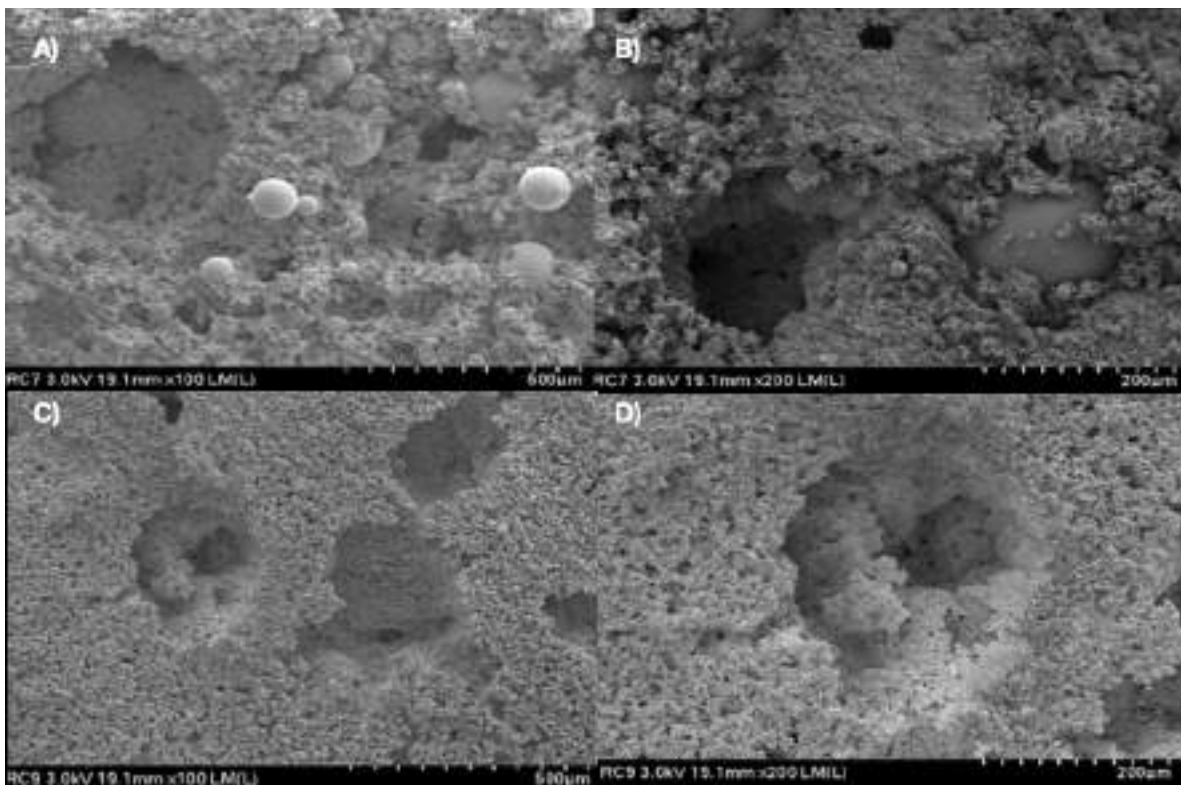


Figura 5 Imágenes de SEM antes y después del proceso de sinterizado en los bloques de HAp+PBMA+PEMA. A y B) En las imágenes pueden apreciarse esferas de HAp+PBMA+PEMA previo al proceso de sinterizado. C y D) Se puede observar la ausencia de la totalidad de esferas de HAp+PBMA+PEMA post-sinterizado, en las cuales se observan porosidades con tamaños promedio de 20-40 μm y de 100-150 μm .

Tamaño de poro (μm)	Función biológica
< 1	Interacción de proteínas, bioactividad
1-20	Adhesión celular
100-1000	Crecimiento celular orientado
> 1000	Forma y función de injerto

Tabla I Tamaño de poro y distribución ideal para los injertos empleados en la ingeniería de tejidos óseos Tripathi., G (2011).

Comparando los resultados previamente descritos, confirmamos que el método de gelcasting modificado, favorece la adhesión celular y el crecimiento celular orientado, de los injertos de HAp sintetizados por esta técnica.

En un estudio bibliográfico, se determinó que los péptidos presentan muchas ventajas en comparación a las proteínas de tamaño completo, tienen un menor costo de producción, producen menor reacción inmunogénica, son más estables lo que les permite ser almacenados por mayor tiempo, pueden inducir diversos procesos celulares como: migración, proliferación, adhesión, diferenciación y mineralización (Bermúdez., M. 2021).

Recientemente se ha determinado por medio de un análisis *in silico* que pCEMP1, presenta una configuración por una hélice en la parte media y a los extremos dos zonas aleatorias, siendo esta conformación característica de proteínas que participan en el proceso de mineralización denominadas proteínas intrínsecamente desordenadas. Adicionalmente describen que el 40 % de la secuencia del péptido está conformada por aminoácidos con cargas positivas y negativas, lo que permite una mayor interacción de este con iones Ca y PO (Montoya., G., et al 2019).

En la figura 6 A y B se aprecian imágenes del grupo control de HAp sin pCEMP1, En la figura 6 C y D pueden observarse cambios morfológicos sobre las nanopartículas de HAp en comparación al grupo control, esto indica que pCEMP1 es una molécula dependiente de temperatura, con una posible interacción sobre algún plano cristalino de la HAp. Estos hallazgos coinciden con estudios previos de otros autores (Correa., R. 2019).

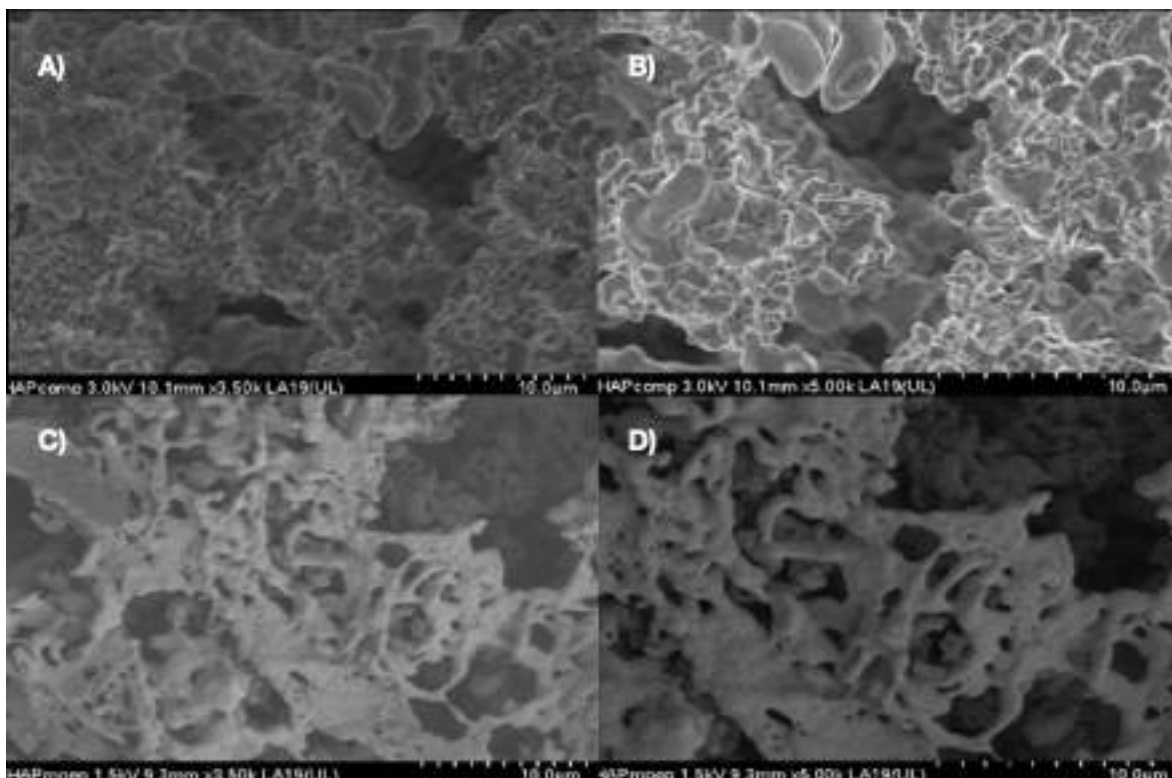


Figura 6 A y B) Imágenes del grupo control de HAp sin pCEMP1. C y D) Las imágenes muestran cambios morfológicos sobre las nanopartículas de HAp y la estructura jerárquica de los poros obtenidos.

El análisis EDS demostro un cambio en la relación Calcio Fósforo de 1.63 (Tabla III). comparada con el grupo control (Tabla II) donde fue de 1.77. Como lo menciona Rivera-Muñoz., E., et al (2011) cuanto más cercano sea el valor de Ca / P a 1.67, mayor será la estabilidad del material dentro del cuerpo humano, ya que tienden a ser inerte.

Tabla II Análisis EDS, HAp sin péptido

Elemento	% atómico
C	24.56
O	53.57
Si	2.53
P	6.97
Ca	12.38

Ca/P: 1.77

Tabla III Análisis EDS, HAp con péptido

Elemento	% atómico
C	3.62
O	49.96
Si	3.11
P	16.45
Ca	26.86

Ca/P : 1.63

Los planos y la fase cristalina en la muestra se analizaron mediante XRD mediante polvos para identificar patrones de crecimiento de la HAp, los cuales nos permitiran saber si existe algun cambio cristalino.

La figura 7 muestra los patrones de difracción de HAp previo a la adición del péptido y proceso de sinterizado, se indican las reflexiones más intensas; en la figura 8 se observa la muestras de HAp posterior al método de gelcasting modificado y adición de pCEMP1; Se indican las reflexiones donde existio un aumento en los planos 112, 213 y 300, de acuerdo a lo descrito por Méndez-Lozano., N. (2016) el crecimiento sobre el plano (300) es un indicativo de crecimiento preferencial sobre el eje “C”, provocando cambios morfológicos al usar diferentes concentraciones de ácido glutámico durante el proceso de sinterizado. Sugiriendo la union del péptido por un plano preferencial hacia el eje c, provocando cambios morfológicos estructurales como los descritos por Montoya., G. (2019).

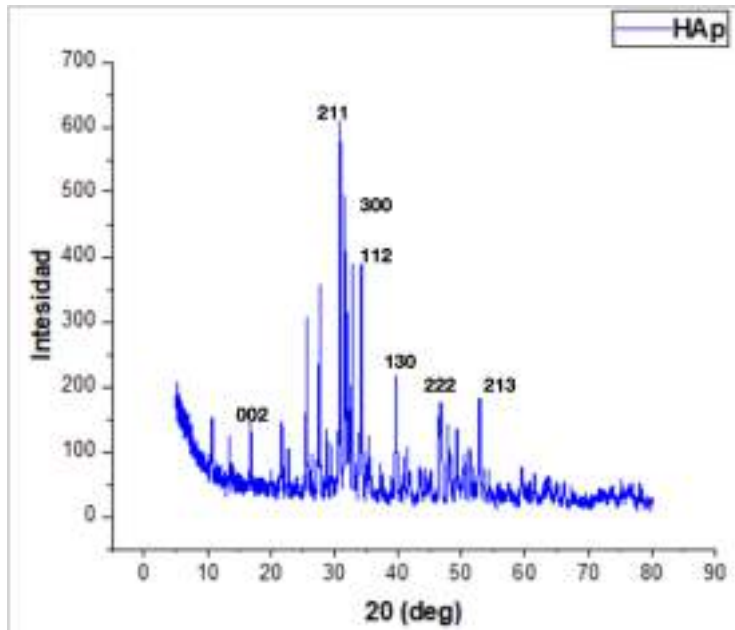


Figura 7 Muestra los patrones de difracción de la HAp pura, se observa un incremento en los planos correspondientes 002, 211, 300, 112, 130, 222, 213.

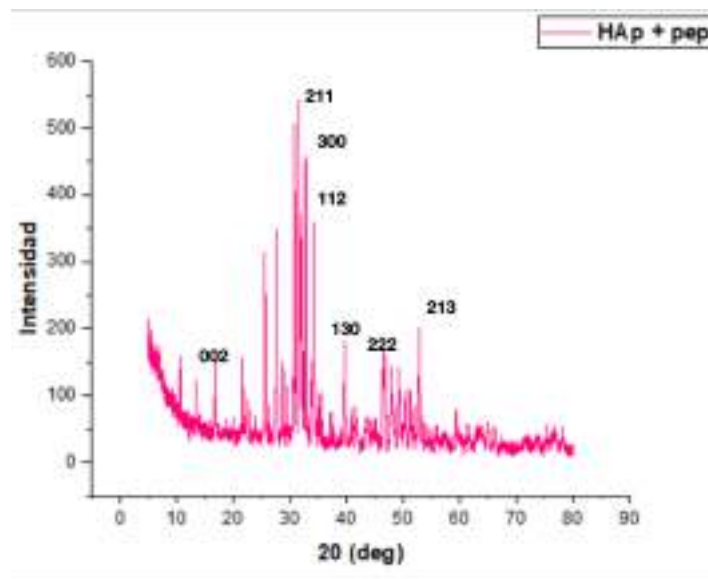


Figura 8 Patrones de difracción de la HAp + pCEMP, después del método de gelcasting modificado, muestran un incremento de los planos 300, 112, 213.

Para obtener mayor información acerca de la estructura molecular y los grupos funcionales presentes en las muestras se utilizó el análisis FTIR-ATR, en la figura 9, se muestran las bandas correspondientes a los grupos PO_4 1040, 950, 800, 725, 605, 564, 503 y 423 cm^{-1} , además de 3570, 1989 y 685 cm^{-1} de grupos OH correspondientes a una muestra de HAp.

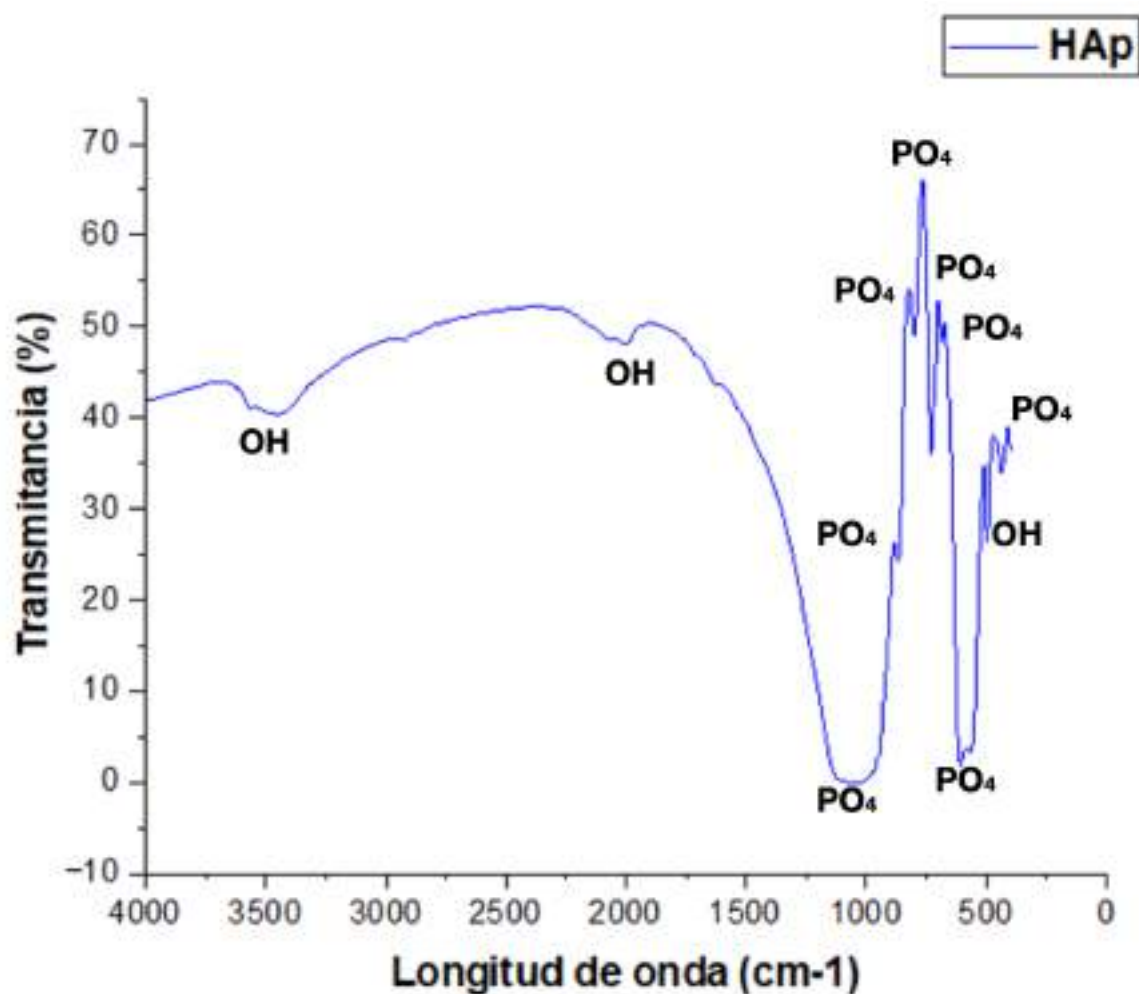


Figura 9 FTIR -ATR HAp. Se muestran las bandas correspondientes a grupos fosfatos 1040, 950, 800, 725, 605, 564, 503 y 423 cm^{-1} , además de 3570, 1989 y 685 cm^{-1} de grupos OH relacionadas a las vibraciones correspondientes de HAp.

Por otra parte en la figura 10, se aprecian bandas en 2924 cm^{-1} correspondientes al grupo Amida B (C-H), en 1639 cm^{-1} del grupo Amida I (C=O), Amida II (N-H y C-H) en las

bandas 1550, 1532 y 1519 cm^{-1} así como los grupos fosfato e hidroxilo correspondientes a la HAp, lo que demuestra una gran afinidad del péptido hacia la HAp a pesar del proceso de sinterizado, así como lo describe en estudios Correa., R. (2019). Debido a que las figuras presentan únicamente las bandas características de la HAp y el péptido, es posible asegurar que la adición de las microesferas de PMMA no afectan las propiedades químicas del material después de haberlo moldeado e inducido a la formación de macroporos. Igualmente en la figura 10 en las bandas correspondientes a los grupos fosfato se puede apreciar una contracción en las longitudes de onda lo que puede interpretarse como los cambios morfológicos descritos en las imágenes previas.

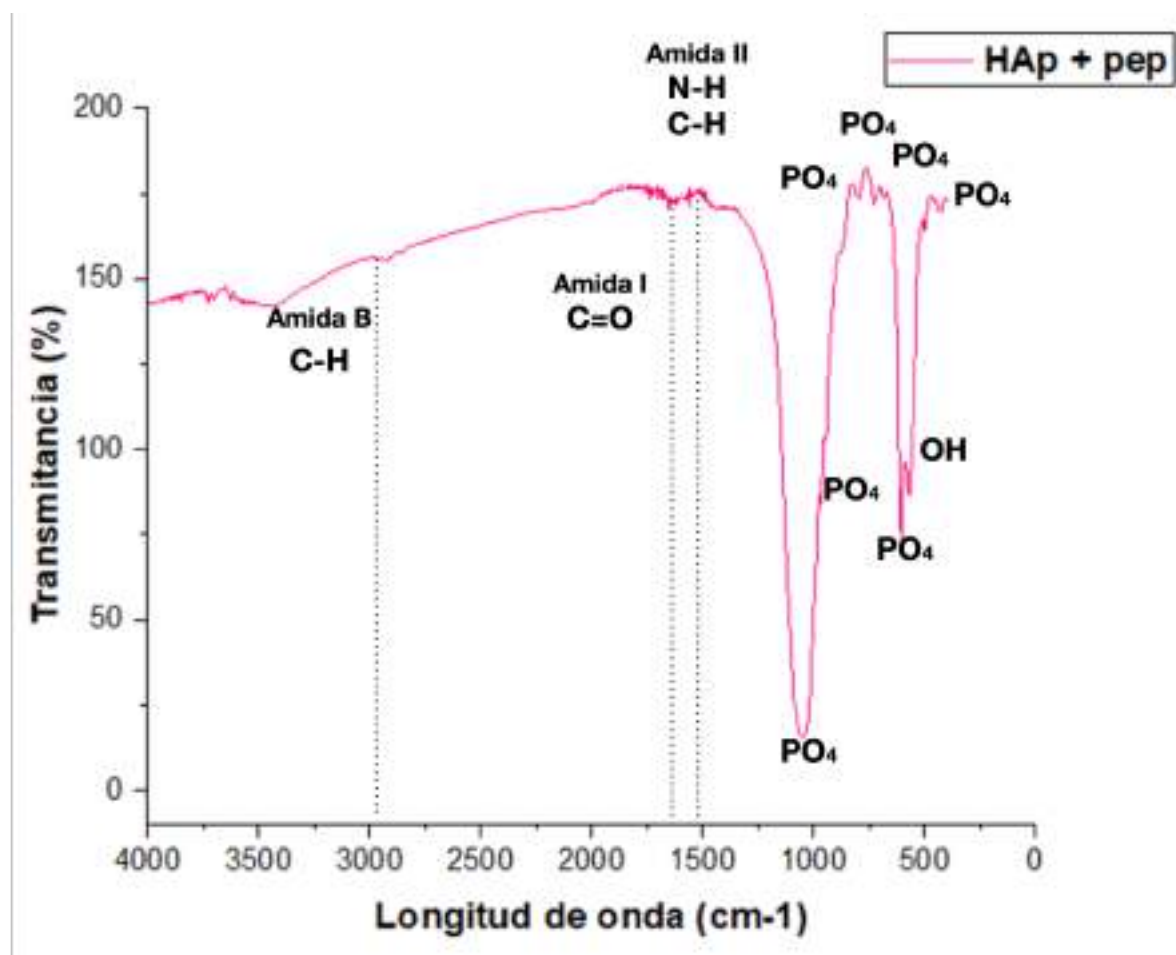


Figura 10 HAp + pCEMP1. Se demuestra la presencia del péptido en la muestra de HAp con bandas en 2924 cm^{-1} correspondientes al grupo Amida B (C-H), en 1639 cm^{-1} del grupo Amida I (C=O), Amida II (N-H y C-H) en las bandas 1550, 1532 y 1519 cm^{-1} . Así como grupos fosfato asignados a HAp en 1054, 946, 796, 729, 689, 606, 571 y 421 cm^{-1} PO₄ y grupos OH en 3429, 1980 y 499 cm^{-1} .

Para conocer a detalle los cambios morfológicos a nivel molecular generados por el péptido las muestras fueron analizadas mediante espectroscopía Raman. El espectro Raman de la HAp en la figura 11, permitió observar bandas características de los fosfatos de calcio en ν_1 PO_4 en 961 cm^{-1} , dos bandas ν_3 PO_4 en 1047 y 1080 cm^{-1} , vibraciones ν_4 PO_4 en 610 , 595 y 584 cm^{-1} y finalmente a 448 y 435 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones ν_2 PO_4 .

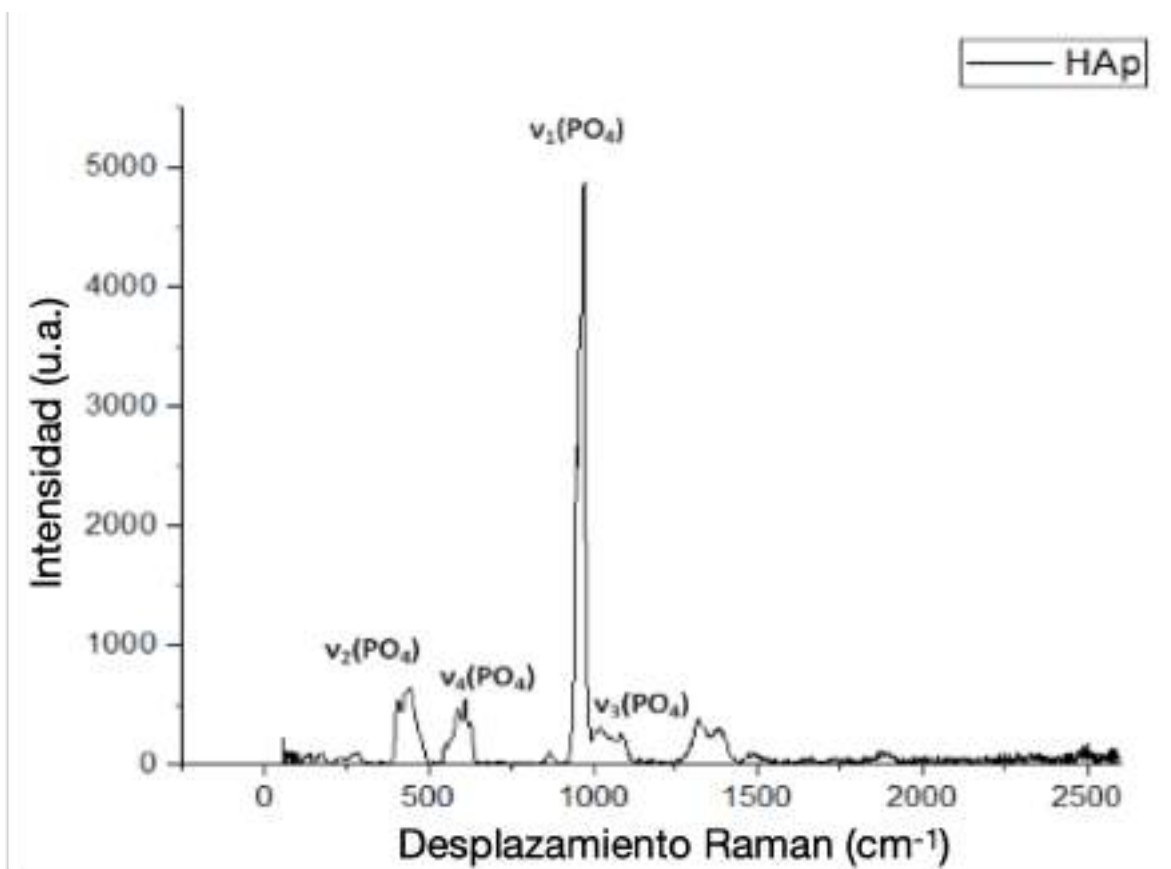


Figura 11 El espectro Raman de HAp, donde se destaca la presencia de un pico intenso a 961 cm^{-1} , asociado al modo ν_1 PO_4 , dos bandas ν_3 PO_4 en 1047 y 1080 cm^{-1} , vibraciones ν_4 PO_4 en 610 , 595 y 584 cm^{-1} y finalmente a 448 y 435 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones ν_2 PO_4 .

En la figura 12 la muestra con pCEMP-13 se distingue un incremento en la banda 595 cm^{-1} y la aparición de una banda en 390 cm^{-1} asociada a pCEMP-13 (flechas rojas); es posible que el incremento en la reacción en tiempo, los grupos fosfatos presenten un mejor ordenamiento espacial, lo que produce estas señales de mayor intensidad en el espectro Raman por la presencia del péptido.

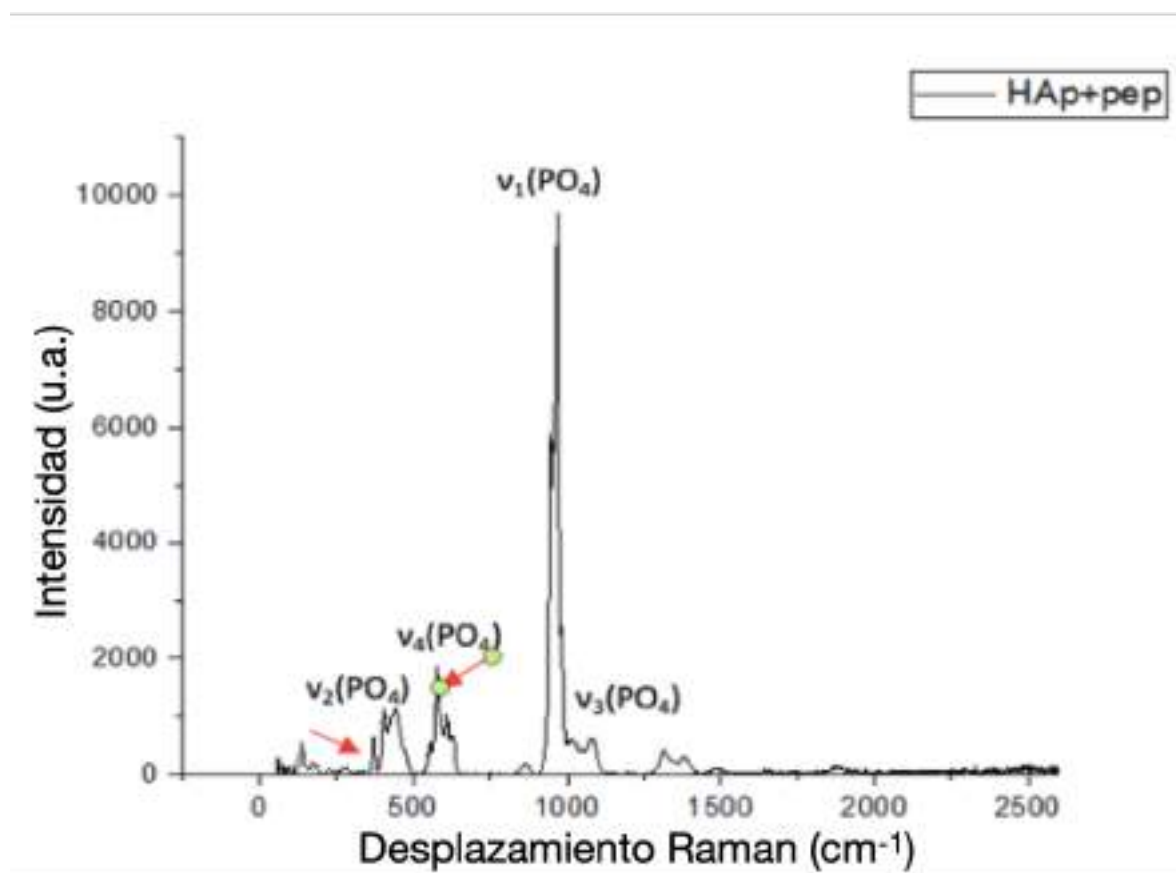


Figura 12 En la muestra obtenida mediante el método gelcasting modificado con pCEMP1 se distingue un incremento en la banda 595 cm^{-1} y la aparición de una banda en 390 cm^{-1} asociada a pCEMP1 (flechas rojas).

VIII. Conclusiones

Dados los resultados obtenidos y después de la discusión correspondiente, podemos concluir lo siguiente:

El método de gelcasting presentó varias ventajas para la síntesis de hidroxiapatita, los moldes pudieron ser elaborados de manera sencilla y reutilizados para otras muestras, la HAp inicial permanece estable e invariante durante todo el proceso, la incorporación de esferas de metacrilatos en diferentes diámetros, permitió controlar la porosidad en los bloques de HAp, estas esferas son completamente eliminadas, mediante el proceso de sinterizado, lo que permite elaborar bloques de injertos cerámicos, personalizables con diferentes porosidades y formas de una manera sencilla, lo que hace al injerto sustancialmente mejor que otros productos por que se mejoraría el desempeño del injerto dentro del huesped ya que por su diseño sería más sencillo la angiogénesis y la interacción celular.

pCEMP1 produce cambios morfológicos en las muestras de HAp, aparentemente con un crecimiento preferencial al plano C, estos cambios muestran una estructura aparentemente más compacta y organizada al compararlos con los grupos control. Asimismo existe un cambio en la relación Ca/P de los especímenes analizados, generando un mejor grado de cristalinidad y por ende obtenemos un producto con mejor grado de cristalinidad.

En base a los resultados de la FTIR-ATR podemos observar una gran afinidad del péptido hacia la molécula de HAp esto a pesar del proceso de sinterizado.

Los resultados de los espectros Raman muestran la aparición de una banda 390 cm^{-1} en la muestra que contiene pCEMP1 así como un incremento en la banda 595 cm^{-1} , lo que sugiere un mejor ordenamiento espacial de la molécula de HAp y la capacidad de nuclear cristales de HAp.

Estos hallazgos son de suma importancia pues no solo demuestran la fuerte afinidad y cambios morfológicos que el péptido presenta sobre las moléculas de HAp hacia un plano más cristalino, si no que también expone que pCEMP1 depende de la temperatura para activarse y que la adición de microesferas de PMMA no afecta las propiedades químicas de los materiales después de haberlos moldeado e inducido a la formación de macroporos.

IX. Propuestas

- Desarrollo de proyectos de investigación con la aplicación de pCEMP1 *in vivo*, para profundizar su resultado y posteriores aplicaciones en uso humano.
- Examinar sobre el comportamiento en la nucleación de cristales a partir de calor, para mejorar y aumentar sus características.

X. Bibliografía

- American Academy of Periodontology. (2001). Glossary of Periodontal Terms 4th Edition. In *Glossary of Periodontal Terms 4th Edition*. <https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.12.1575>
- Azami, M., Samadikuchaksaraei, A., & Poursamar, S. A. (2010). Synthesis and characterization of a laminated hydroxyapatite/gelatin nanocomposite scaffold with controlled pore structure for bone tissue engineering. *International Journal of Artificial Organs*. <https://doi.org/10.1177/039139881003300204>
- B.F., R., & M.P., B. (2013). Bone graft substitutes: Claims and credibility. *Seminars in Arthroplasty*. <https://doi.org/10.1053/j.sart.2013.07.002>
- Becker, W., Urist, M. R., Tucker, L. M., Becker, B. E., & Ochsenein, C. (1995). Human Demineralized Freeze-Dried Bone: Inadequate Induced Bone Formation in Athymic Mice. A Preliminary Report. *Journal of Periodontology*. <https://doi.org/10.1902/jop.1995.66.9.822>
- Bosshardt, D. D., & Selvig, K. A. (1997). Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontology 2000*, 13(1), 41–75. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00095.x>
- Bosshardt, D. D., Zalzal, S., Mckee, M. D., & Nanci, A. (1998). Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. *Anatomical Record*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199801\)250:1<13::AID-AR3>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199801)250:1<13::AID-AR3>3.0.CO;2-F)
- Bowen, J. A., Mellonig, J. T., Gray, J. L., & Towle, H. T. (1989). Comparison of Decalcified Freeze-Dried Bone Allograft and Porous Particulate Hydroxyapatite in Human Periodontal Osseous Defects. *Journal of Periodontology*. <https://doi.org/10.1902/jop.1989.60.12.647>
- Bowers, G., Feiton, F., Middleton, C., Glynn, D., Sharp, S., Mellonig, J., Corio, R., Emerson, J., Park, S., Suzuki, J., Ma, S., Romberg, E., & Reddi, A. H. (1991). Histologic Comparison of Regeneration in Human Intrabony Defects When Osteogenin Is Combined With Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft and With Purified Bovine Collagen. *Journal of Periodontology*. <https://doi.org/10.1902/jop.1991.62.11.690>
- Bronzino, E. J. D., Park, J. B., & Kim, Y. K. (2000). Park, J. B. “Biomaterials.” *Biomedical Engineering*.
- Carmona-Rodríguez, B., Álvarez-Pérez, M. A., Narayanan, A. S., Zeichner-David, M., Reyes-Gasga, J., Molina-Guarneros, J., García-Hernández, A. L., Suárez-Franco, J. L., Chavarría, I. G., Villarreal-Ramírez, E., & Arzate, H. (2007). Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(3), 763–769. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.204>
- Chen, B., Zhang, T., Zhang, J., Lin, Q., & Jiang, D. (2008). Microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite obtained by gel-casting process. *Ceramics International*. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2006.10.021>
- Chen, F. M., & Liu, X. (2016). Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. In *Progress in Polymer Science*. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>
- Chong, C. H., Carnes, D. L., Moritz, A. J., Oates, T., Ryu, O. H., Simmer, J., & Cochran, D. L. (2006). Human Periodontal Fibroblast Response to Enamel Matrix Derivative, Amelogenin, and Platelet-Derived Growth Factor-BB. *Journal of Periodontology*. <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050147>
- Cohen, J. (1958). The Chemical Dynamics of Bone Mineral. William F. Neuman and Margaret W. Neuman Chicago, The University of Chicago Press, 1958. \$5.00. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. <https://doi.org/10.2106/00004623-195840020-00031>
- Correa, R., Arenas, J., Montoya, G., Hoz, L., Lopez, S., Salgado, F., Arroyo, R., Salmeron, N., Romo, E., Zeichner-David, M., & Arzate, H. (2019). Synthetic cementum protein 1-derived peptide regulates mineralization in vitro and promotes bone regeneration in vivo. *FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.201800434RR>
- Duheyne, P., Beight, J., Cuckler, J., Evans, B., & Radin, S. (1990). Effect of calcium phosphate coating characteristics on early post-operative bone tissue ingrowth. *Biomaterials*, 11(8), 531–540. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(90\)90073-Y](https://doi.org/10.1016/0142-9612(90)90073-Y)
- Elliott, J. C., Mackie, P. E., & Young, R. A. (1973). Monoclinic hydroxyapatite. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.180.4090.1055>
- Faour, O., Dimitriou, R., Cousins, C. A., & Giannoudis, P. V. (2011). The use of bone graft substitutes in large cancellous voids: Any specific needs? *Injury*. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.020>
- Fernandez de Grado, G., Keller, L., Idoux-Gillet, Y., Wagner, Q., Musset, A. M., Benkirane-Jessel, N., Bornert, F., & Offner, D. (2018). Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives

- for large bone defects management. *Journal of Tissue Engineering*, 9. <https://doi.org/10.1177/2041731418776819>
- Froum, S., & Stahl, S. S. (1987). Human Intraosseous Healing Responses to the Placement of Tricalcium Phosphate Ceramic Implants. *Journal of Periodontology*. <https://doi.org/10.1902/jop.1987.58.2.103>
- Fulmer, M. T., Ison, I. C., Hankermayer, C. R., Constantz, B. R., & Ross, J. (2002). Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. *Biomaterials*. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00180-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00180-6)
- Gao, C., Deng, Y., Feng, P., Mao, Z., Li, P., Yang, B., Deng, J., Cao, Y., Shuai, C., & Peng, S. (2014). Current progress in bioactive ceramic scaffolds for bone repair and regeneration. In *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms15034714>
- García-Gareta, E., Coathup, M. J., & Blunn, G. W. (2015). Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. In *Bone*. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.07.007>
- Glimcher, M. J. (1989). Mechanism of calcification: Role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *The Anatomical Record*, 224(2), 139–153. <https://doi.org/10.1002/ar.1092240205>
- Gu, Y., Wang, G., Zhang, X., Zhang, Y., Zhang, C., Liu, X., Rahaman, M. N., Huang, W., & Pan, H. (2014). Biodegradable borosilicate bioactive glass scaffolds with a trabecular microstructure for bone repair. *Materials Science and Engineering C*. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.12.023>
- Hägewald, S., Pischon, N., Jawor, P., Bernimoulin, J. P., & Zimmermann, B. (2004). Effects of enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.02.063>
- He, J., Jiang, J., Safavi, K. E., Spångberg, L. S. W., & Zhu, Q. (2004). Direct contact between enamel matrix derivative (EMD) and osteoblasts is not required for EMD-induced cell proliferation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.03.006>
- Ivarez-Pérez, M. A., Narayanan, S., Zeichner-David, M., Rodríguez Carmona, B., & Arzate, H. (2006). Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone*, 38(3), 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.09.009>
- Johnson, K. A., Hessle, L., Vaingankar, S., Wennberg, C., Mauro, S., Narisawa, S., Goding, J. W., Sano, K., Millan, J. L., & Terkeltaub, R. (2000). Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.4.r1365>
- Kang, N. H., Kim, S. J., Song, S. H., Choi, S. M., Choi, S. Y., & Kim, Y. J. (2013). Hydroxyapatite synthesis using EDTA. *Journal of Craniofacial Surgery*. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e318290258b>
- Kao, R. T., Murakami, S., & Beirne, O. R. (2009). The use of biologic mediators and tissue engineering in dentistry. *Periodontology 2000*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2008.00287.x>
- Kay, M. I., Young, R. A., & Posner, A. S. (1964). Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/2041050a0>
- Kulinets, I. (2015). Biomaterials and their applications in medicine. In *Regulatory Affairs for Biomaterials and Medical Devices*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857099204.1>
- Li, P., Ohtsuki, C., Kokubo, T., Nakanishi, K., Soga, N., Nakamura, T., & Yamamuro, T. (1993). Process of formation of bone-like apatite layer on silica gel. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 4(2), 127–131. <https://doi.org/10.1007/BF00120381>
- Li, Panjian, Ohtsuki, C., Kokubo, T., Nakanishi, K., Soga, N., Nakamura, T., & Yamamuro, T. (1992). Apatite Formation Induced by Silica Gel in a Simulated Body Fluid. *Journal of the American Ceramic Society*, 75(8), 2094–2097. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1992.tb04470.x>
- Li, Y., Zhao, S., Nan, X., Wei, H., Shi, J., Li, A., & Gou, J. (2016). Repair of human periodontal bone defects by autologous grafting stem cells derived from inflammatory dental pulp tissues Rocky Tuan; Timothy O'Brien. *Stem Cell Research and Therapy*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0404-2>
- Liu, J., Ye, X., Wang, H., Zhu, M., Wang, B., & Yan, H. (2003). The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method. *Ceramics International*. [https://doi.org/10.1016/S0272-8842\(02\)00210-9](https://doi.org/10.1016/S0272-8842(02)00210-9)
- Lizarbe Iracheta, M. (2007). Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *Revista de La Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*.
- Londoño López, M., Echevarría, A., & De La Calle, F. (2006). Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *Revista EIA*, 5, 109–118.

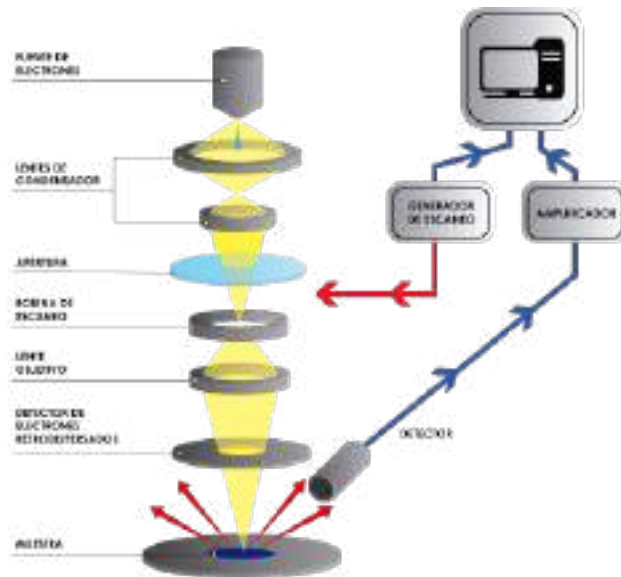
- Lu, H., Liu, Y., Guo, J., Wu, H., Wang, J., & Wu, G. (2016). Biomaterials with antibacterial and osteoinductive properties to repair infected bone defects. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms17030334>
- M., E. (2011). Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization. In *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. InTech. <https://doi.org/10.5772/19123>
- Matarasso, M., Iorio-Siciliano, V., Blasi, A., Ramaglia, L., Salvi, G. E., & Sculean, A. (2015). Enamel matrix derivative and bone grafts for periodontal regeneration of intrabony defects. A systematic review and meta-analysis. In *Clinical Oral Investigations*. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1491-7>
- Mellonig, J. T. (1991). Freeze-dried bone allografts in periodontal reconstructive surgery. In *Dental Clinics of North America*.
- Miao, D., & Scutt, A. (2002). Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. <https://doi.org/10.1177/002215540205000305>
- Miron, R. J., Wei, L., Bosshardt, D. D., Buser, D., Sculean, A., & Zhang, Y. (2014). Effects of enamel matrix proteins in combination with a bovine-derived natural bone mineral for the repair of bone defects. *Clinical Oral Investigations*. <https://doi.org/10.1007/s00784-013-0992-5>
- Montoya, G., Correa, R., Arenas, J., Hoz, L., Romo, E., Arroyo, R., Zeichner-David, M., & Arzate, H. (2019). Cementum protein 1-derived peptide (CEMP 1-p1) modulates hydroxyapatite crystal formation in vitro. *Journal of Peptide Science*, 25(10), 1–11. <https://doi.org/10.1002/psc.3211>.
- Nanci, A. (1999). Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: Relationship to speed of formation and collagen packing density. *Journal of Structural Biology*. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4137>
- NE, S., WV, G., & MJ, S. (2000). Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology 2000*, 100, 143–155.
- Omatete, O. O., Janney, M. A., & Strehlow, R. A. (1991). Gelcasting – A New Ceramic Forming Process. *American Ceramic Society Bulletin*.
- Park, J. B. (1984). *Biomaterials Science and Engineering*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2769-1>
- Park, J., & Lakes, R. S. (2007). Biomaterials: An introduction: Third edition. In *Biomaterials: An introduction: Third edition*. <https://doi.org/10.1007-978-0-387-37880-0>
- Potoczek, M., Zima, A., Paszkiewicz, Z., & Ślósarczyk, A. (2009). Manufacturing of highly porous calcium phosphate bioceramics via gel-casting using agarose. *Ceramics International*. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2008.12.006>
- Ratner, B. D., & Hench, L. (1999). Perspectives on biomaterials. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. [https://doi.org/10.1016/s1359-0286\(99\)00051-0](https://doi.org/10.1016/s1359-0286(99)00051-0)
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2013). Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00148-0>
- Ren, F., Ding, Y., Ge, X., Lu, X., Wang, K., & Leng, Y. (2012). Growth of one-dimensional single-crystalline hydroxyapatite nanorods. *Journal of Crystal Growth*. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2012.04.003>
- Rivera-Muñoz, E., Díaz, J. R., Rogelio Rodríguez, J., Brostow, W., & Castaño, V. M. (2001). Hydroxyapatite spheres with controlled porosity for eye ball prosthesis: Processing and characterization. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(4), 305–311. <https://doi.org/10.1023/A:1011290919642>
- Rivera-Munoz, E. M., Huirache-Acuna, R., Velázquez, R., Alonso-Núñez, G., & Eguía-Eguía, S. (2011). Growth of hydroxyapatite nanoparticles on silica gels. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.3437>
- Rivera-Muñoz, E., Velázquez, R., & Rodríguez, R. (2003). Improvement in mechanical properties of hydroxyapatite objects with controlled porosity made by modified gelcasting process. *Materials Science Forum*, 426–432(5), 4489–4494. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/msf.426-432.4489>
- Rivera-Muñoz, Eric, Curiel, R., & Rodríguez, R. (2003). Selectivity in the hydroxyapatite synthesis from eggshell using different thermal treatments. *Materials Research Innovations*, 7(2), 85–90. <https://doi.org/10.1007/s10019-003-0233-7>
- Roach, H. I. (1994). Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biology International*. <https://doi.org/10.1006/cbir.1994.1088>
- Saenz, A. (2004). Biomateriales. *Tecnología En Marcha*, 17(1), 34–45.

- Sanders, J. J., Sepe, W. W., Bowers, G. M., Koch, R. W., Williams, J. E., Lekas, J. S., Mellonig, J. T., Pelleu, G. B., & Gambill, V. (1983). Clinical Evaluation of Freeze-Dried Bone Allografts in Periodontal Osseous Defects: Part III. Composite Freeze-Dried Bone Allografts With and Without Autogenous Bone Grafts. *Journal of Periodontology*. <https://doi.org/10.1902/jop.1983.54.1.1>
- Schlueter, S. R., Carnes, D. L., & Cochran, D. L. (2007). In Vitro Effects of Enamel Matrix Derivative on Microvascular Cells. *Journal of Periodontology*. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060111>
- Sculean, A., Windisch, P., Keglevich, T., Chiantella, G. C., Gera, I., & Donos, N. (2003). Clinical and histologic evaluation of human intrabony defects treated with an enamel matrix protein derivative combined with a bovine-derived xenograft. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. <https://doi.org/10.11607/prd.00.0509>
- Selvig, K. A. (1965). The fine structure of human cementum. *Acta Odontologica Scandinavica*, 23(4), 423–441. <https://doi.org/10.3109/00016356509007523>
- Sepe, W. W., Bowers, G. M., Lawrence, J. J., Friedlaender, G. E., & Koch, R. W. (1978). Clinical Evaluation of Freezedried Bone Allografts in Periodontal Osseous Defects-Part II. *Journal of Periodontology*. <https://doi.org/10.1902/jop.1978.49.1.9>
- Sheikh, Z., Najeeb, S., Khurshid, Z., Verma, V., Rashid, H., & Glogauer, M. (2015). Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. In *Materials*. <https://doi.org/10.3390/ma8095273>
- Subramaniam, S., Fang, Y. H., Sivasubramanian, S., Lin, F. H., & Lin, C. pin. (2016). Hydroxyapatite-calcium sulfate-hyaluronic acid composite encapsulated with collagenase as bone substitute for alveolar bone regeneration. *Biomaterials*, 74, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.044>
- Tan, L., Yu, X., Wan, P., & Yang, K. (2013). Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review. *Journal of Materials Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2013.03.002>
- Varma, H. K., & Sivakumar, R. (1996). Dense hydroxy apatite ceramics through gel casting technique. *Materials Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(96\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(96)00121-8)
- Villora, J. M., Callejas, P., & Barba, M. F. (2002). Métodos de síntesis y comportamiento térmico del Hidroxiapatito. *Boletín de La Sociedad Espanola de Ceramica y Vidrio*, 41(5), 443–450. <https://doi.org/10.3989/cyv.2002.v41.i5.663>
- Yamamoto, T., Hasegawa, T., Yamamoto, T., Hongo, H., & Amizuka, N. (2016). Histology of human cementum: Its structure, function, and development. *Japanese Dental Science Review*, 52(3), 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2016.04.002>
- Yamamoto, T., Li, M., Liu, Z., Guo, Y., Hasegawa, T., Masuki, H., Suzuki, R., & Amizuka, N. (2010). Histological review of the human cellular cementum with special reference to an alternating lamellar pattern. *Odontology*, 98(2), 102–109. <https://doi.org/10.1007/s10266-010-0134-3>
- Yu, X., Tang, X., Gohil, S. V., & Laurencin, C. T. (2015). Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. In *Advanced Healthcare Materials*. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400760>
- Yukna, R. A., & Mellonig, J. T. (2000). Histologic Evaluation of Periodontal Healing in Humans Following Regenerative Therapy With Enamel Matrix Derivative. A 10-Case Series. *Journal of Periodontology*. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.5.752>

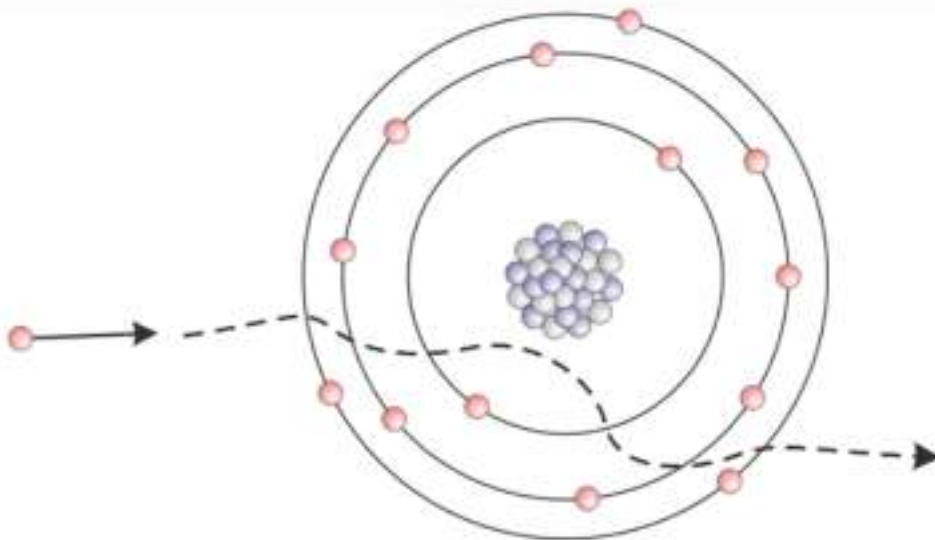
XI. Anexos



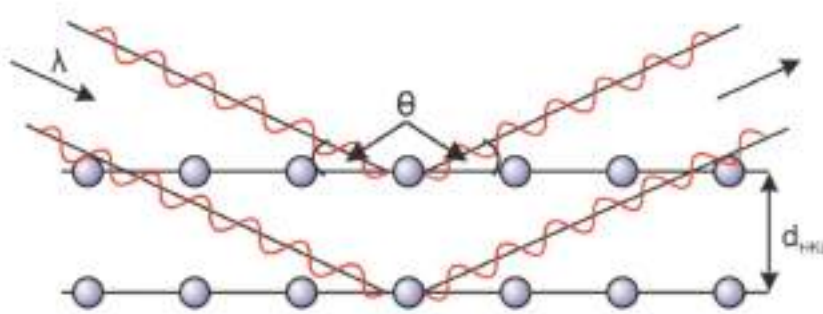
Anexo 1 microscopio electrónico de Barrido marca Hitachi modelo SU8230.



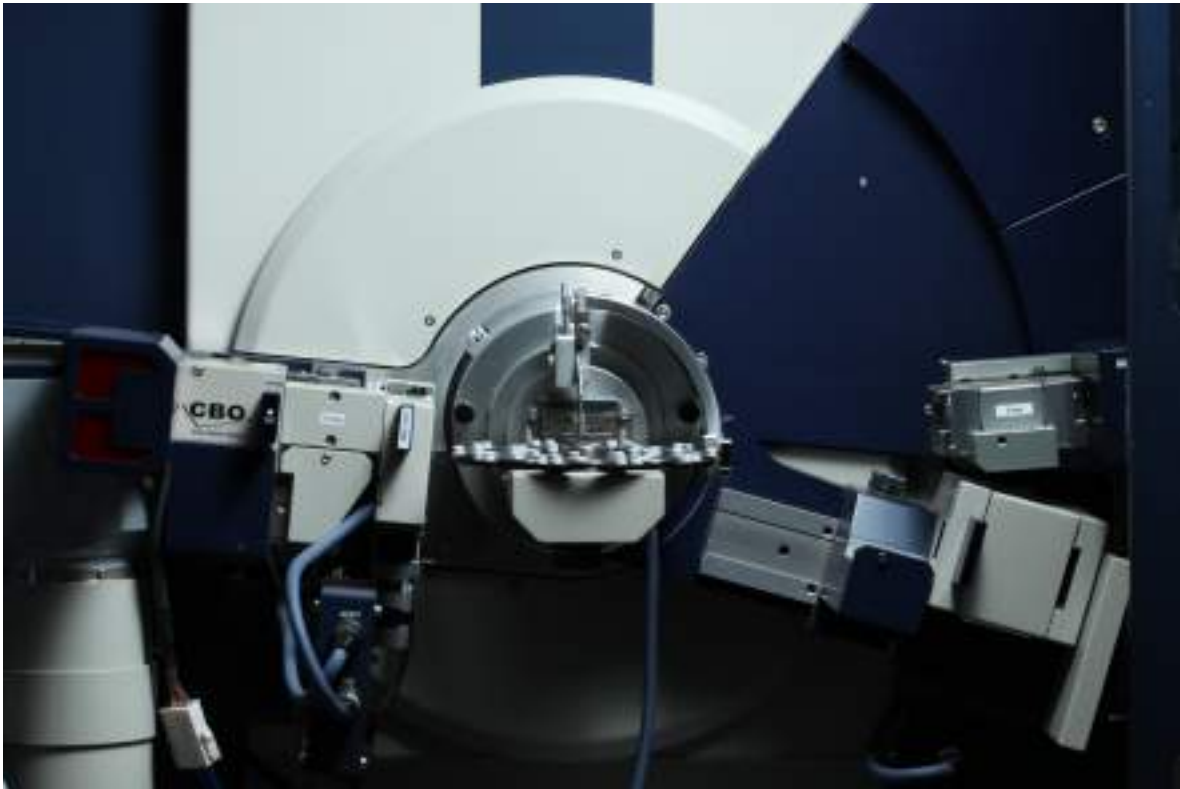
Anexo 2 principio de microscopio electrónico de barrido



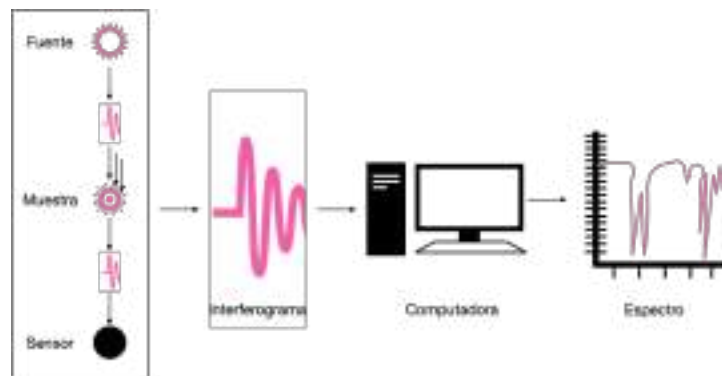
Anexo 3 difracción de rayos x



Anexo 4 Difracción de rayos x



Anexo 5 Difractómetro Rigaku UIV modelo miniflex.



Anexo 6 espectroscopía



Anexo 7 espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific serie APWi200342