



**CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Análisis *in silico* de la interacción entre un péptido de la  
sialoproteína ósea y el cristal hidroxapatita”**

T E S I S

Que presenta

ARELY SARAHI SANTANA CEDILLO

Para obtener el grado de  
MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE  
BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de la tesis:

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Ciudad de México

Agosto, 2021

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioingeniería de tejidos del Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez, en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **Directores de tesis:**

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez  
Facultad de Odontología, UNAM

Dra. María Carmen Sánchez Torres  
Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

### **Asesores:**

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos  
Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda  
Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

La C. Arely Sarahi Santana Cedillo realizó esta tesis de Maestría con una beca otorgada por CONACYT (no. 1009035)

## DEDICATORIAS

*A mis padres Martha Cedillo T. y Fernando Santana S. por ser los principales promotores de mis metas, por su esfuerzo y apoyo incondicional a lo largo de mi crecimiento, tanto profesional como personal, les dedico cada logro.*

*A mis hermanos Rubí, Fernando y Brenda por ser mi ejemplo a seguir. Por apoyarme y aconsejarme en cada momento.*

*A mis sobrinos Leslye, Ángel y Aylín que me brindan su alegría y me motivan a ser cada día mejor*

*A mis tíos y tías quienes han estado siempre al pendiente de mí durante mi formación académica.*

*A Daniel por su permanente apoyo, por creer en mí y alentarme a cumplir mis objetivos.*

## AGRADECIMIENTOS

- Agradezco el apoyo por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto A1-S-9178 del programa del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, que ha permitido la realización de esta investigación.
- Agradezco el apoyo por parte del programa DGAPA-UNAM: PAPIIT IN213821 que ha permitido la realización de esta investigación.
- Al CONACYT por otorgarme la beca con el número de apoyo 1009035 que me permitió realizar mis estudios de maestría en el departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV.
- A mi Director de tesis el Dr. Marco Antonio Alvares Pérez, por acercarme al gusto de la investigación en el campo de la Ingeniería tisular ósea. Por brindarme su apoyo guía y confianza para la realización del presente trabajo de investigación. Por ser siempre muy comprensivo y respetuoso.
- A mi Directora de tesis la Dra. Ma. Carmen Sánchez Torres, por permitirme realizar este proyecto de investigación y su constante contribución para su mejoramiento. Por su apoyo y tiempo brindado para el desarrollo y culminación del presente estudio.
- A mis asesores: el Dr. Marco Antonio Meraz Ríos y el Dr. Nicolas Villegas Sepúlveda por todas las observaciones y sugerencias compartidas para la mejora del proyecto.
- Al Dr. Eduardo Villarreal por su apoyo y orientación en el área de simulación de dinámica molecular.
- A mis compañeros de laboratorio que con sus observaciones y preguntas ayudaron al mejoramiento del presente trabajo.
- A todos los que, de una manera u otra, contribuyeron a la culminación del presente grado de estudio.

## ÍNDICE

RESUMEN EN ESPAÑOL.....	5
RESUMEN EN INGLÉS .....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
1. Tejidos mineralizados humanos.....	10
1.1. Órganos dentarios .....	10
1.2 Huesos .....	11
1.3 Matriz extracelular (MEC).....	12
2. Biomineralización .....	14
2.1 Proceso de mineralización.....	14
2.2 Defectos de la biomineralización .....	18
3. Proteínas SIBLING.....	21
4. Características de la sialoproteína ósea (BSP) .....	26
5. Simulación de dinámica molecular (SDM) .....	29
JUSTIFICACIÓN .....	36
HIPÓTESIS.....	36
OBJETIVO GENERAL.....	37
OBJETIVOS PARTICULARES.....	37
METODOLOGÍA .....	37
1. Simulación de dinámica molecular .....	37
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	39
RESULTADOS .....	40
1. Radio de giro .....	41

2. Fluctuación cuadrática media (RMSF).....	42
3. Factor B.....	43
4. Distancia entre el péptido y la hidroxiapatita .....	45
DISCUSIÓN .....	47
CONCLUSIONES.....	53
PERSPECTIVAS.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55

## ABREVIATURAS

**Ace:** Acetilo.

**ALP:** Fosfatasa alcalina (Alkaline phosphatase).

**Arg:** Arginina.

**Asn:** Asparagina.

**BSP:** Sialoproteína Ósea (Bone sialoprotein).

**D:** Acido aspártico.

**DC:** Dicroísmo Circular.

**DE:** Desviación Estándar.

**DLS:** Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering).

**DMO:** Densidad Mineral Ósea.

**DMP-1:** Proteína de matriz dentinaria-1 (Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein-1).

**DPP:** Fosfoforina dentinaria (Dentin phosphoprotein).

**DSP:** Sialoproteína de la dentina (Dentin sialoprotein).

**DSPP:** Sialofosfoproteína dentinaria (Dentin Sialophosphoprotein).

**DXA:** Absorciometría dual de rayos X.

**E:** Acido glutámico.

**Glu:** Acido Glutámico.

**Gly:** Glicina.

**GROMACS:** Del acrónimo, Groningen Machine for Chemical Simulation.

**HA:** Hidroxiapatita.

**IBSP:** Integrin Binding Sialoprotein.

**IDPs:** Proteínas intrínsecamente desordenadas (Intrinsically Disordered Proteins).

**IDR:** Regiones intrínsecamente desordenadas (Intrinsically Disordered Regions).

**Lys:** Lisina.

**MEC:** Matriz Extracelular.

**MEPE:** Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein).

**NH<sub>2</sub>:** Grupo amino.

**nm:** Nanómetro.

**ns:** Nanosegundo.

**OPN:** Osteopontina.

**P1:** Péptido 1.

**PDB:** Protein Data Bank.

**ps:** Picosegundos.

**pS:** Fosfoserina.

**pT:** Fosfotreonina.

**pY:** Fosfotirosina.

**PNC:** Proteínas No Colágenas.

**PrDOS:** Protein Disorder prediction System.

**Pro:** Prolina.

**Rg:** Radio de giro.

**RGD:** Tripéptido Arginina, Glicina, ácido aspártico, dominio de unión a integrina.



**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear.

**RMSF:** Fluctuación cuadrática media (Root mean square fluctuation).

**S:** Serina.

**SAXS:** Difracción de rayos X de bajo ángulo (Small angle X-ray scattering).

**SDM:** Simulación de Dinámica Molecular.

**SIBLING:** Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins.

**Val:** Valina

**VMD:** Visual Molecular Dynamics

## RESUMEN EN ESPAÑOL

El presente trabajo tiene por objetivo analizar la interacción entre un péptido de la sialoproteína ósea (BSP) y la red cristalina de hidroxapatita (HA). La BSP es una proteína ácida que se encuentra en los tejidos mineralizados, principalmente al inicio de la formación del tejido óseo. La BSP tiene la capacidad de interactuar con iones, colágeno, e HA, regulando el proceso de mineralización; sin embargo, su mecanismo de acción, la naturaleza de sus enlaces y sus cambios estructurales aún se desconocen.

Para alcanzar el objetivo de la investigación propuesta se realizaron simulaciones de dinámica molecular (SDM) utilizando el programa GROMACS, como estrategia para detectar la interacción del péptido comprendido entre los residuos 4-23 (péptido 1) de la secuencia primaria de BSP y la superficie del cristal de HA. Para esto, fueron establecidos dos sistemas virtuales a estudiar: el péptido aislado y el péptido en presencia de HA, ambos en solución acuosa. Cada sistema se mantuvo en simulación durante 30 nanosegundos.

Los datos obtenidos por la SDM indicaron que el péptido se mantiene altamente compacto y flexible en solución, basándose en los valores de radio de giro y de fluctuación cuadrática media. Sin embargo, dichos valores en presencia de HA indican que el péptido adquiere una conformación abierta y rígida.

Por otro lado, el análisis de la trayectoria del péptido durante la simulación reveló que la interacción entre el péptido y la HA se establece mediante los grupos carboxilos presentes en las cadenas laterales de los ácidos glutámicos en las posiciones 16 y 17 y la carga positiva del calcio que se encuentra expuesta en el cristal de HA.

Estos hallazgos realizados *in silico* sugieren que las interacciones entre los residuos 4-23 de la BSP se basan en fuerzas de carácter electrostático, lo que abre una nueva posibilidad de entender el papel de la BSP en su totalidad en la regulación de la nucleación del cristal de HA.

## RESUMEN EN INGLÉS

The present work aims to analyze the interaction between a peptide of the bone sialoprotein (BSP) and the hydroxyapatite (HA) crystal lattice. BSP is an acidic protein found in mineralized tissues, mainly at the beginning of bone tissue formation. BSP can interact with ions, collagen, and HA, regulating the mineralization process; however, its mechanism of action, the nature of its bonds, and its structural changes are still unknown.

To achieve the main objective of the proposed research, molecular dynamics simulations (MDS) were performed using the GROMACS program as a strategy to detect the interaction of the peptide comprised between the residues 4-23 (peptide 1) of BSP primary sequence and the HA crystal surface. In our study, two virtual systems of study were established: 1) the isolated peptide and 2) the peptide in the presence of HA, both systems in an aqueous solution. Each MDS design was running for 30 nanoseconds.

The data obtained by MDS indicated that the peptide in solution remains highly compact and flexible based on the values of radius of gyration and of root mean square fluctuation. However, the peptide acquires an open and rigid conformation in the presence of HA.

Furthermore, the analysis of the trajectory of the peptide during the simulation revealed that the interaction between the peptide and HA is established between the carboxyl groups of the glutamic acid side chains at positions 16 and 17 and the positive charge of calcium that is exposed in the HA crystal.

In conclusion, these findings carried out *in silico* suggested that the interactions between residues 4 to 23 of BSP are due to electrostatic forces, which opens a new possibility for understanding how the protein plays an essential role in the regulation of HA crystal nucleation in bone tissue.

## INTRODUCCIÓN

La biomineralización es un proceso mediante el cual se controla la deposición de minerales en la matriz extracelular (MEC), produciendo estructuras complejas como el tejido óseo y los órganos dentarios del cuerpo humano (1). Los huesos y dientes contienen una MEC considerada como un biomaterial híbrido orgánico-inorgánico. En su fase orgánica, dicho biomaterial híbrido se encuentra compuesto principalmente (en un 90%) de colágeno tipo I, mientras que su fase inorgánica se compone principalmente por hidroxiapatita (HA), un mineral formado a base de fosfatos de calcio. El 10% restante de la fase orgánica lo constituyen principalmente las denominadas proteínas no colágenas (PNC) (2). Las PNC forman un grupo especial de proteínas con un papel fundamental en la formación, maduración, remodelado y organización de la MEC, así como en la regulación de las interacciones célula-MEC, y tienen una influencia directa en las propiedades biomecánicas del tejido mineral, proporcionando elasticidad y resistencia al estrés mecánico (1, 2).

Dentro del grupo de las PNC destaca una familia de proteínas conocidas como SIBLING (del inglés Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins), las cuales son codificadas por genes que encuentran en tándem en el cromosoma 4q21 en humanos y 5qE5 en ratones. Estas proteínas han sido asociadas con la formación de los tejidos mineralizados y se ha reportado que sus funciones se relacionan con la generación y mantenimiento del tejido óseo; además, se consideran como uno de los actores principales en la biología de los tejidos mineralizados (3, 4).

La familia de proteínas SIBLING forman un grupo estructural y filogenéticamente homogéneo que comprende 5 proteínas; la sialofosfoproteína dentinaria (DSPP), la proteína de matriz dentinaria-1 (DMP-1), la osteopontina (OPN), la fosfoglucoproteína de la matriz extracelular (MEPE) y la sialoproteína ósea (BSP). Dentro de este grupo de proteínas se han descubierto dominios intrínsecamente desordenados que corresponden entre el 50 al 80% del total de su secuencia de aminoácidos (1, 4, 5). A este grupo de proteínas se les conoce como IDPs (Intrinsically Disordered Proteins) y se caracterizan por carecer de una estructura tridimensional definida bajo condiciones fisiológicas y mantener una estructura al azar o desordenada, no asumiendo una típica

estructura secundaria ( $\alpha$ -hélice u hoja- $\beta$ ), además de ser hidrofílicas y contar por lo general con dominios cargados negativa o positivamente. Una característica común en las IDPs es el gran contenido de aminoácidos ácidos, como ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D), así como el gran número de aminoácidos fosforilados. Estos residuos se agrupan en múltiples dominios o tripletes repetidos en su secuencia como: ácido aspártico-serina-serina (DSS) o ácido glutámico-serina-serina (ESS), donde la serina es a menudo fosforilada, con diversas combinaciones posibles (DpSpS, EpSpS), para las cuales aún no se explora su función. Otra característica importante es que las IDPs no cumplen con el paradigma estructura-función clásica, su flexibilidad les permite tener distintos ligandos y por ello múltiples funciones. Además, pueden sufrir transiciones estructurales del desorden al orden al unirse a alguno de sus ligandos (colágeno, HA, calcio, entre otros) (6-8). Estas proteínas representan el ~30% del proteoma (9, 10).

Durante el fenómeno de biomineralización la mayoría de las proteínas que participan en la formación del cristal de HA son IDPs, con algunas excepciones de proteínas con estructuras tridimensionales como colágeno, osteocalcina, fosfatasa alcalina (ALP), y osteonectina (4). Las IDPs que participan en la biomineralización no solo promueven la formación inicial de HA, sino que controlan su crecimiento e inhiben su formación en momentos precisos (2, 3). La naturaleza flexible y elongada de las IDPs les permite tener mayor superficie para poder controlar la estructura y morfología de los cristales de HA. La proteína DSPP es escindida por la acción de una proteasa en dos productos altamente desordenados conocidos como la sialoproteína de la dentina (DSP) y la fosfoforina dentinaria (DPP) (11, 12). Se ha descrito que la BSP es una proteína intrínsecamente desordenada, y DMP1 tiene transiciones del desorden al orden cuando se une a sus ligandos colágeno,  $\text{Ca}^{2+}$  e HA (13, 14). Además, se ha demostrado que las estructuras flexibles de las IDPs tienen cambios en su estructura secundaria al estar fosforiladas, al unirse al  $\text{Ca}^{2+}$  y a la HA (5). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual las IDPs pertenecientes a la familia SIBLING participan en el proceso de biomineralización, la forma en que interactúan con la MEC, colágeno, HA, y los arreglos moleculares que sufren en la posible función nucleadora de cristales de

fosfato de calcio que eventualmente maduran hasta formar la HA presente en la MEC de los tejidos mineralizados.

La BSP es una de las proteínas no colágenas más abundantes y constituye hasta el 15% de las PNC del hueso humano (15). El gen humano de BSP (*IBSP*) codifica una proteína de 317 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 16 residuos (16). Su estructura primaria tiene un peso molecular de 33.6 kDa, mientras la proteína glicosilada tiene un peso de ~70 kDa. La BSP es rica en oligosacáridos con un alto contenido de ácido siálico y un alto grado de fosforilación que contribuyen a una carga global negativa. Del centro al extremo amino terminal la BSP es rica en aminoácidos ácidos donde incluye dos segmentos de ácido poliglutámico y serinas que tienen el potencial de ser fosforiladas, mientras que en su porción más próxima al extremo carboxilo terminal posee una secuencia RGD, región de unión a integrina (17).

A partir de estudios de simulación de dinámica molecular (SDM), realizados en el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología de la UNAM con distintos segmentos o péptidos de la proteína BSP, se lograron identificar regiones posiblemente involucradas en el proceso de nucleación de la HA dentro de la secuencia primaria de aminoácidos que corresponden a péptidos de los residuos 4-23, 24-54, 55-83 (datos no publicados). Dichas regiones se ubican en el extremo amino terminal, considerado como altamente conservado entre mamíferos (17) y poseen una secuencia primaria con una carga predominantemente negativa. Debido a la aparente participación de la BSP en el inicio de la mineralización, Hunter (1993) investigó sus efectos en soluciones de calcio y fósforo mediante el uso de un sistema de gel de agarosa en estado estacionario, demostrando que la BSP estimula la formación de cristales de HA (18). Sin embargo, la función precisa de BSP aún no se comprende completamente, en gran parte debido a la falta de información experimental sobre la estructura de BSP a nivel atómico, tanto de la proteína en solución como unida a la superficie de cristales de HA (19).

Debido a que las interacciones proteína-ion y proteína-superficie mineral desempeñan un papel esencial durante el proceso de biomineralización y subsecuente formación del tejido óseo, su estudio es de fundamental importancia biomédica. Dilucidar estas

interacciones y la manera en la que se establecen, podría ayudar a comprender los mecanismos mediante los cuales la proteína BSP participa en la formación de tejido óseo. Asimismo, la SDM representa una herramienta que podría ayudar a la descripción de las interacciones y que eventualmente podría utilizarse para el diseño inteligente de péptidos con potencial terapéutico en diversos procesos como la regeneración ósea.

Basados en lo anterior, el analizar *in silico* la interacción del péptido comprendido entre el residuo 4 al 23 del extremo amino terminal de la proteína BSP con la HA contribuirá a entender el papel que juega en la generación de cristales de HA y en el proceso de mineralización de la MEC para la formación de los denominados tejidos mineralizados. Esto a su vez permitirá evaluar la importancia que pueda tener dicho péptido para su potencial uso en la ingeniería de tejidos como huesos y órganos dentarios.

## **1. Tejidos mineralizados humanos**

Se denomina tejido mineralizado al conjunto de células que cumplen con una función en común y cuya matriz extracelular se caracteriza por contener una fase orgánica y una fase mineral cristalina. Dichas fases pueden variar en cuanto a su composición, proporción y estructura de acuerdo con el tipo de tejido, el organismo y la función a cumplir (20). En los sistemas vertebrados, como en los humanos, los tejidos mineralizados se encuentran en los órganos dentarios y en los huesos (1, 21).

### **1.1. Órganos dentarios**

Los componentes mineralizados en los órganos dentarios son la dentina, el esmalte y el cemento. La dentina forma la porción más grande de un diente, se ubica en la región coronaria entre el esmalte y la pulpa dental. Este tejido se encuentra 70% mineralizado en peso, con el contenido orgánico representando el 20% de la matriz, y el 10% restante es agua; en su porción orgánica posee colágeno tipo I, tipo III y V (1, 22). El

cemento es el tejido que recubre a la dentina al nivel de la raíz del diente, cumpliendo con la función de unir al órgano dentario con el hueso alveolar mediante el ligamento periodontal. Dicho tejido cuenta con una composición similar a la del hueso, contiene aproximadamente entre un 45% y un 50% de mineral en peso, y en su fase orgánica abunda el colágeno tipo I con baja presencia de colágeno tipo III (23). El esmalte es el tejido duro que recubre únicamente la superficie exterior de los dientes, se trata de un material muy diferente al de los tejidos mencionados por su abundante contenido mineral (96 % en peso) y por poseer un contenido mínimo de colágeno del tipo I y V, siendo el tejido más duro del cuerpo humano (1, 22). En conjunto dichos tejidos cumplen con diversas funciones además de la masticación (cortar, mezclar y triturar los alimentos ingeridos), como participar en el intercambio iónico y propiciar una correcta fonética y estética facial (24).

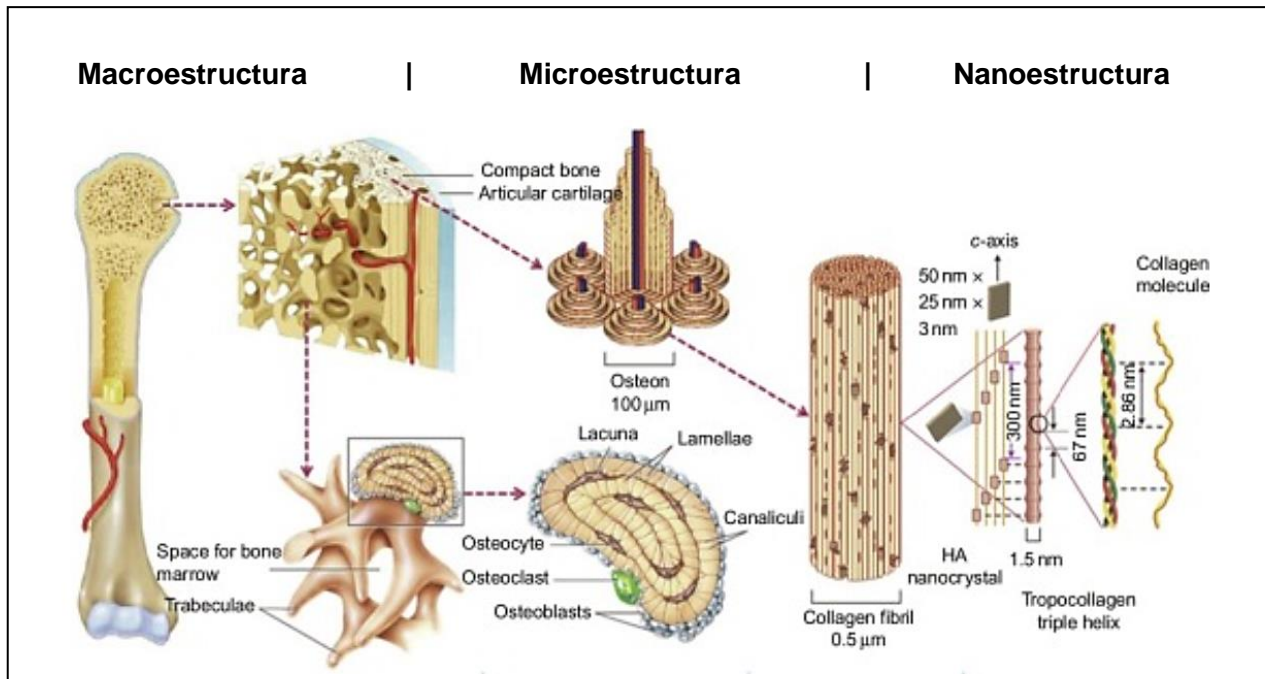
## **1.2 Huesos**

Los huesos cuentan con el tejido óseo, el cual es un tipo especializado de tejido conjuntivo cuya constitución de matriz extracelular es de un 25% agua, 25% proteínas y 50% minerales (25). El tejido óseo sirve de sostén para los tejidos blandos, proporciona puntos de inserción para los tendones; protege de lesiones a órganos internos importantes (por ejemplo, las vértebras protegen a la médula espinal y los huesos del cráneo al cerebro), brinda asistencia para el movimiento, proporciona un medio adecuado para la producción de células sanguíneas, y cumple una importante función en la homeostasis mineral almacenando distintos minerales (calcio, fósforo y hierro en forma de ferritina) para mantener la estructura y solidez del hueso. Además, estos minerales son liberados al torrente sanguíneo para distribuirlos a otras partes del cuerpo donde se requieren para funciones vitales (25).

Los tejidos mineralizados se constituyen a partir de estructuras jerárquicamente organizadas que han evolucionado con el tiempo para cumplir con su propósito biológico; de esta manera el hueso tiene estructuras que van desde la macroescala hasta la nanoescala.



Macroscópicamente es evidente la morfología de las estructuras óseas como huesos largos o cortos, los cuales pueden contar con una arquitectura de hueso cortical o trabecular. A lo largo del hueso cortical (también llamado compacto) y al nivel de la microescala (de 1 a 500  $\mu\text{m}$ ) se encuentran estructuras tubulares llamadas osteonas o sistemas de Havers que contienen vasos sanguíneos y nervios, los cuales proveen nutrientes a las células maduras del tejido óseo (osteocitos), mientras que en el hueso trabecular (también llamado esponjoso) se identifica a las trabéculas simples. En la nanoescala (de unos cientos de nanómetros a 1  $\mu\text{m}$ ) se ubican el colágeno, proteínas no colágenas y minerales, los cuales forman parte de la matriz extracelular y es el nivel de escala donde ocurren los procesos de interés para el presente estudio (26, 27).



**Figura 1.** Estructura jerárquica del tejido óseo (25).

### 1.3 Matriz extracelular (MEC)

Los huesos y dientes contienen una MEC considerada como un biomaterial híbrido orgánico-inorgánico.

### 1.3.1. Porción inorgánica:

Constituye aproximadamente el 65% (puede variar de 50-70%) del total de la MEC y está conformada por minerales (sales inorgánicas), fundamentalmente fosfatos cálcicos en forma de cristales de HA que se disponen sobre y entre las fibras de colágeno (1, 2).

La HA es el principal componente inorgánico y se presenta como apatita biológica, con la fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . El cristal de HA pertenece al grupo espacial cristalino  $\text{P6}_3/\text{m}$ . Las repeticiones de las celdas unitarias de apatita biológica producen cristales de varios tamaños. En el hueso, los cristales tienen 2-6 nm de espesor, 30-50 nm de ancho y 60-100 nm de largo (región que se denomina como eje C) (1). Se propone que cada cristal de apatita tiene tres compartimentos, el interior, la superficie, y la capa de hidratación externa, los cuales están disponibles para el intercambio de iones. Se considera que la apatita biológica se construye sobre un patrón de red iónico definido que permite una variación considerable en su composición mediante la sustitución, el intercambio y la adsorción de iones presentes en su entorno (28).

### 1.3.2. Porción orgánica:

Constituye un 35% del total de la MEC y se conforma principalmente por colágeno tipo I que representa el 90% del total de las proteínas presentes en el hueso, mientras que el 10% restante corresponde a proteínas no colágenas (1, 2).

El colágeno consiste en una triple hélice, formada por dos cadenas idénticas llamadas  $\alpha_1$  y una cadena  $\alpha_2$  que se caracterizan por poseer la secuencia en triplete Gly-X-Y, donde X suele ser Pro, e Y hidroxipro. Otros colágenos como III y V se encuentran presentes en baja proporción (1). Las proteínas no colágenas (PNC) se pueden clasificar en proteínas que contienen  $\gamma$ -carboxiglutamato, proteoglicanos y las proteínas SIBLING. Todas ellas participan en el mantenimiento de las interacciones célula-MEC, así como en la formación, maduración, remodelado y organización de la MEC (2).

La composición y estructura de la matriz ósea proporciona las características y propiedades específicas al hueso; las fibras de colágeno proporcionan flexibilidad y

resistencia a la tracción, mientras que el componente mineral es responsable de la dureza, rigidez y resistencia a la compresión. Se ha observado que la remoción o modificación de la matriz orgánica altera la manera en que se forma el mineral constituyente, lo que puede modificar las propiedades del tejido, por lo que resulta de gran interés la comprensión del proceso de mineralización (29).

## **2. Biomineralización**

La biomineralización es el proceso mediante el cual se controla la deposición de minerales en la MEC (1). Es un proceso biológico dinámico que da origen a los tejidos conectivos mineralizados especializados. Como primer paso tiene lugar la secreción de una matriz orgánica que funge como andamio al servir de guía y sostén para la posterior deposición de los minerales cristalizados.

### **2.1 Proceso de mineralización**

#### **2.1.1. Secreción de matriz orgánica:**

El proceso inicia con la secreción del material orgánico por parte de los osteoblastos (colágeno tipo I y proteínas no colágenas) que en conjunto forman el depósito de osteoide (matriz ósea no mineralizada) de la siguiente manera:

Dentro de la célula se traducen hebras  $\alpha$  de colágeno de 1000 aminoácidos con repetidos de Gly cada tres aminoácidos y una secuencia señal. A esta molécula se le denomina pre-pro-colágeno. Posteriormente ingresa al retículo endoplásmico rugoso perdiendo su péptido señal por acción enzimática (pro-colágeno), donde se hidroxila en residuos Pro y Lys (gracias a la enzima prolil hidroxilasa/lisil hidroxilasa). Las hidroxiprolinas e hidroxilisinas favorecen la estabilidad de la molécula de colágeno y permiten el entrecruzamiento de varias triples hélices. Posteriormente el péptido se glicosila en residuos de Lys; es entonces cuando las 3 hebras se entrecruzan mediante puentes de hidrogeno entre la amida de la Gly y un oxígeno del carbonilo de la prolina

(enlace intercadena), formando un heterotrímero (compuesto por dos cadenas  $\alpha 1$  + una cadena  $\alpha 2$ ), el cual tiene aproximadamente 1.5 nm de diámetro y más de 300 nm de largo. El dominio de la triple hélice está flanqueado por terminales pro-péptidos -N y -C no helicoidales. Esta forma de colágeno, conocida como pro-colágeno, es entonces secretada por las células ocupando los espacios extracelulares donde mediante la eliminación de los pro-péptidos (terminales -N y -C) se convierte en tropocolágeno.

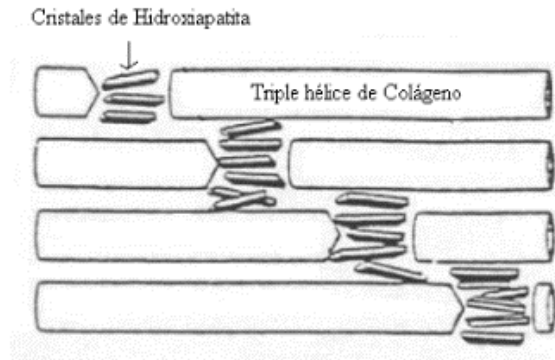
El tropocolágeno puede autoensamblarse para dar lugar a las fibrillas con la ayuda de la lisil oxidasa, que desamina para crear grupos aldehídos que permitan formar enlaces entrecruzados covalentes. La fibrilla se construye a partir del empaquetamiento escalonado de las moléculas de colágeno individuales, de modo que hay espacios periódicos a lo largo de la superficie de la fibrilla y canales que se extienden a través de ella. Cada unidad de colágeno se superpone a las unidades vecinas en aproximadamente 67 nm. Las fibrillas contienen regiones de separación de 40 nm entre unidades de colágeno de extremo a extremo. Por último, el empaquetamiento de colágeno se estabiliza por interacciones débiles como puentes de hidrógeno, así como por fuertes enlaces cruzados intermoleculares lo que resulta esencial para su estabilidad estructural (1).

#### 2.1.2. Deposición de minerales:

Después de mantener aproximadamente 15 días la secreción de la matriz orgánica comienza propiamente la primera fase de mineralización, la cual es un proceso rápido que cumple con el 70% de la mineralización total, mientras que la fase secundaria o mineralización completa es más lenta y puede durar de meses a años. Este proceso de acumulación de minerales dentro de cada sitio de hueso recién formado sucede en un patrón de mineralización ordenado y específico (1).

Robinson y Watson (31) mostraron por primera vez que existen cristales de HA dentro del colágeno (deposición intrafibrilar) donde el eje c del cristal se ubica casi paralelamente al eje largo de la fibrilla de colágeno. Esta disposición tiene lugar durante la primera fase de mineralización donde los nucleados de la matriz se forman

preferentemente de manera organizada y paralela dentro de las regiones de separación de 40 nm de las fibrillas de colágeno, lo que genera una arquitectura a nivel nanoestructural que consiste en nanocristales de HA orientados uniaxialmente incrustados y alineados de forma paralela al eje largo de la fibrilla de colágeno (1, 30, 31).



**Figura 2.** Deposición intrafibrilar de los cristales de hidroxiapatita (30).

A pesar de que se acepta de manera general que la mayoría del mineral depositado en la MEC existe con esta disposición intrafibrilar, se ha demostrado que los cristales pueden continuar su crecimiento y eventualmente superar el tamaño del espacio entre las triples hélices del colágeno, pudiendo existir tanto dentro como fuera de las fibrillas de colágeno (deposición interfibrilar) (1).

Aún no se comprende bien la naturaleza de las interacciones entre el colágeno y el mineral cristalizado; no obstante, es probable que participen enlaces iónicos formados entre los carboxilos de las cadenas laterales de los aminoácidos que constituyen el colágeno y los iones calcio de las partículas minerales (32).

Se han planteado diversas teorías sobre los mecanismos responsables del proceso inicial de cristalización. Algunas de estas propuestas son: 1) formación de cristales en una fase mineral, desarrollada directamente a partir de una solución sobresaturada de los iones minerales; 2) entrega de conjuntos de iones Ca y PO<sub>4</sub> por parte de vesículas;

3) participación de las proteínas SIBLING para regular los procesos de nucleación. Adicionalmente se propone que estos mecanismos pueden ser aplicables a la vez (33).

En términos químicos, un mineral precipita cuando se excede su solubilidad. La formación de cristales *de novo* (nucleación) puede tener lugar cuando las concentraciones iónicas de la solución aumentan y los iones chocan con suficiente energía para formar un núcleo crítico o grupos de iones no estructurados (amorfo); a partir de aquí la energía requerida para el crecimiento del cristal es menor, el núcleo crítico continúa acumulando iones y se convierte en un cristal con un grupo espacial definido (29).

La biomineralización está controlada por las células del tejido y las proteínas que producen dichas células. Las proteínas no colágenas secretadas por las células del hueso (osteoblastos) participan activamente en el proceso de mineralización controlando aspectos como cuánto y dónde se deposita el cristal mineral, determinando así la calidad y las propiedades biomecánicas de la matriz mineralizada producida (3, 29). De manera general, se considera que las cadenas laterales de los aminoácidos con carga, de polipéptidos que se encuentran en la MEC, contribuyen a los sitios de atracción y unión para los iones de calcio y fosfato que se encuentran en el fluido supersaturado circundante de los tejidos. Las configuraciones llevarían a estos iones a una asociación estrecha y conducirían a su nucleación. El crecimiento y desarrollo de apatita seguiría a los eventos de nucleación iniciales para dar como resultado cristales que crecen preferentemente a lo largo de los ensamblajes de colágeno (1). Asimismo, las proteínas no colágenas de la MEC pueden intervenir en cualquier paso de la mineralización y regular el proceso por ejemplo, cubriendo la superficie del mineral y regulando el tamaño o la forma de ese mineral, al delimitar el espacio en el que se agregaran nuevos iones (29).

La biomineralización ósea es un proceso complejo con diversas teorías que describen los mecanismos responsables donde se han implicado distintos factores como agonistas y antagonistas de la mineralización (1). La alteración en algún punto del proceso de deposición de minerales cristalinos sobre la matriz extracelular orgánica puede dar lugar a condiciones desfavorables para la salud (1).

## 2.2 Defectos de la biomineralización

En individuos sanos los mecanismos involucrados en el proceso de biomineralización limitan la formación y el depósito de minerales a los sitios donde se encuentran los tejidos conectivos especializados óseo y dental. Dentro de estos tejidos, como se ha expuesto anteriormente, la formación de minerales se desarrolla de manera ordenada. Dicho proceso debe mantenerse bajo estricto control tanto en el desarrollo como en el crecimiento y durante la edad adulta. La alteración de este proceso en cualquier punto a lo largo de la vida puede dar lugar a condiciones patológicas de la mineralización (34).

Una de las principales propiedades de los tejidos mineralizados es la rigidez y resistencia, característica que no presentan el resto de los tejidos blandos. Esta característica está dada por la mineralización ordenada de sus fibras, lo que aumenta su dureza pero disminuye su flexibilidad. Sin embargo, dentro del esqueleto los huesos constituyentes presentan distintas características macroscópicas y variaciones en sus propiedades. La capacidad de un hueso para resistir a las fuerzas externas depende de su tamaño, morfología y densidad. Así, los huesos cortos y anchos pueden resistir más un impacto que los huesos largos, mientras que un hueso más mineralizado es más resistente que otro que se encuentre mineralizado en menor cantidad. No obstante, si las fuerzas que actúan sobre el tejido sobrepasan su resistencia se producen fracturas, lo que evidencia la importancia del grado de mineralización para el mantenimiento de huesos sanos; este factor se contempla dentro de la denominada densidad mineral ósea (DMO) (34-36).

La DMO se refiere a la cantidad de masa ósea por unidad de volumen, y la técnica más empleada para medirla es la absorciometría dual de rayos X (DXA). Dicha técnica mide la cantidad de HA en los huesos utilizando 2 haces de rayos X de baja densidad (36). A partir de este análisis se obtiene un puntaje T (T-score) que, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se interpreta de la siguiente manera:

- T-score dentro de 1 DE (Desviación Estándar) de la media adulta joven (valor de referencia): densidad ósea normal.
- T-score de 1 a 2.49 de DE debajo del valor de referencia, (-1 a -2.49 DE): nivel bajo de masa ósea u osteopenia.
- T-score de 2.5 DE o más por debajo del referente, (de -2.5 DE o menos): osteoporosis (37).

La osteoporosis se define como una enfermedad sistémica del esqueleto caracterizada por una excesiva disminución de la masa ósea, deterioro de la microarquitectura y aumento de la fragilidad del tejido óseo con el consecuente aumento en la susceptibilidad a fracturas (36). Dichas fracturas pueden ocurrir de forma espontánea o ante la presencia de fuerzas y eventos traumáticos que en condiciones normales no ocasionarían tal consecuencia. A nivel microscópico el hueso osteoporótico presenta en sus porciones trabecular y compacta una estructura caracterizada por un descenso tanto de la matriz proteica como del componente mineral (36).

De manera general, una disminución de la biomineralización origina un aumento en la flexibilidad dando origen a enfermedades osteopenizantes, como la osteoporosis, favoreciendo los eventos de fractura por falta de resistencia. Por el contrario, una mineralización excesiva puede tener un efecto de aumento de la fragilidad debido a la pérdida de elasticidad que brinde la capacidad de absorber las fuerzas externas, dando origen a la condición que se denomina osteopetrosis (34).

Los procesos patológicos de la biomineralización también pueden resultar en mineralización ectópica, que consiste en la formación y deposición de minerales en tejidos blandos (1). La mineralización ectópica con efectos perjudiciales para la salud se puede observar en diversas enfermedades ya sean genéticas o adquiridas. En la calcificación o mineralización ectópica el mineral formado puede ser HA u otro tipo de sales de calcio como el oxalato o fosfato octacálcico (38). Algunos ejemplos de la calcificación patológica en tejidos blandos son: la formación de cálculos biliares, la osteoartritis debido a la calcificación que tiene lugar en las articulaciones, las diversas



mineralizaciones que pueden originarse en el sistema cardiovascular (o en las prótesis cardiovasculares) y los cálculos urinarios. Dentro de estas, se ha puesto especial interés en las que ocurren dentro del sistema cardiovascular, ya que contribuyen a un aumento de la morbilidad y la mortalidad (34).

Las calcificaciones cardiovasculares tienen lugar debido a que las células de los vasos sanguíneos tales como los pericitos, los miofibroblastos y las células endoteliales vasculares pueden adquirir una diferenciación osteoblástica (39). Durante la progresión de la diferenciación hacia células osteoblásticas la calcificación vascular transcurre de manera similar al proceso de biomineralización que tiene lugar en los tejidos duros. Los estímulos y vías de señalización que participan en el inicio de este proceso no están claras; sin embargo cada vez hay más evidencias que apoyan que los mecanismos de calcificación de los tejidos blandos son similares a los observados en el desarrollo esquelético normal (34).

Una de las condiciones patológicas más estudiadas es la esclerosis valvular aórtica, caracterizada por un engrosamiento de las valvas de la válvula y la formación de nódulos de calcio que ocasionan rigidez. Aunque anteriormente sólo se consideraba una enfermedad propia del envejecimiento, ahora se sabe que es un proceso mediado por células que presentan metaplasia ósea (cambio o transformación) (38).

Se han identificado como factores desencadenantes a las especies reactivas de oxígeno asociadas a citocinas inflamatorias, hipertensión y factores de crecimiento, para la diferenciación de células intersticiales valvulares en osteoblastos. Las células comienzan a sufrir una remodelación de su matriz extracelular y el tejido aumenta su actividad angiogénica, se comienzan a expresar moléculas responsables de la diferenciación como el factor de transcripción Cbfa1, y proteínas no colágenas de matriz extracelular responsables de la biomineralización como osteopontina, osteocalcina y sialoproteína ósea, creando así el microambiente adecuado para promover la mineralización. La organización espacial de las fibrillas de colágena, en la MEC de las células intersticiales valvulares, recrea el nicho de crecimiento de cristales de las células óseas, por lo que las condiciones físico-químicas específicas que

conducen a la precipitación mineral favorecen la formación y deposición de los cristales (38).

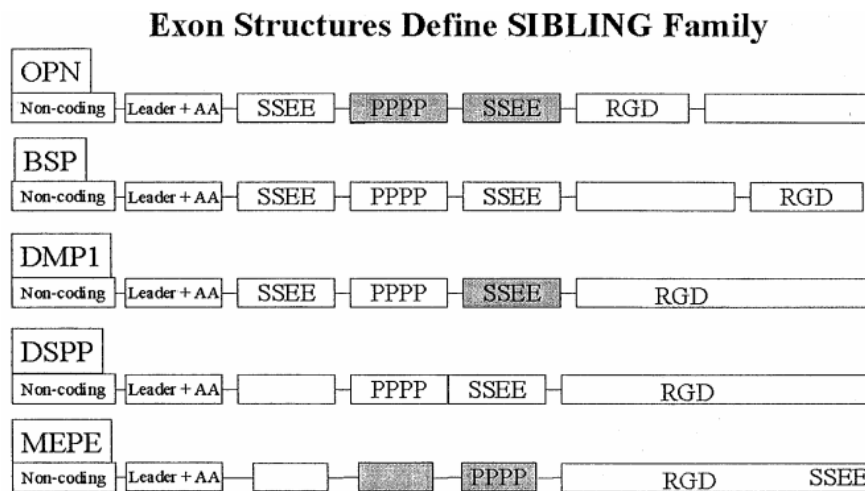
Se ha observado que los minerales formados en la esclerosis valvular aórtica se componen de fosfatos de calcio cristalino. A nivel nanoestructural los cristales se encuentran estrechamente unidos a la matriz proteica y se caracterizan por poseer un tamaño y forma variables, así como una organización en diferentes escalas espaciales, por lo que la formación de cristales dentro de las válvulas cardíacas está relacionada con la presencia de una bioapatita patológica muy heterogénea (38). Continuando a escalas nanométricas, también se han asociado a algunas proteínas de la matriz extracelular con calcificaciones vasculares y calcificaciones de otros tejidos blandos. Dichas proteínas se encuentran dentro del grupo denominado SIBLING (29).

### **3. Proteínas SIBLING**

Como parte de las proteínas no colágenas presentes en la MEC de los tejidos mineralizados se encuentra la familia denominada SIBLING, las cuales son un grupo de proteínas filogenética y estructuralmente homogéneas que han sido asociadas con la formación de los tejidos mineralizados. Sus funciones se han relacionado con la generación y mantenimiento del tejido óseo, y se consideran como uno de los actores principales en la biología de los tejidos mineralizados (3, 4).

Las proteínas SIBLING son codificadas por genes que se ubican en tándem en el cromosoma 4q21 en humanos (5qE5 en ratones) dentro de un segmento estimado de 750,000 pb (39). La principal evidencia para la agrupación de las proteínas en una familia es la similitud de sus límites intrón-exón y las similitudes bioquímicas de sus exones correspondientes. El exón 1 siempre es un exón no codificante. El exón 2 contiene el codón de inicio de la traducción, una secuencia líder y los codones que codifican para los dos primeros aminoácidos de las proteínas maduras. La secuencia líder codifica una serie de aminoácidos hidrofóbicos que dirige la síntesis de proteínas al retículo endoplásmico rugoso para la modificación postraduccional y la posterior

secreción fuera de la célula. El exón 3 generalmente codifica una secuencia que contiene un sitio de fosforilación de caseína quinasa II (SSEE), y el exón 4 suele codificar secuencias relativamente ricas en prolina (PPPP). El exón 5 generalmente codifica secuencias que contienen residuos ácidos, así como, serinas que pueden presentar fosforilación y, como todos los primeros cuatro exones, se trata de un exón de longitud pequeña. Los últimos uno o dos exones presentan una longitud mayor, codifican una gran parte de la proteína total, y siempre contienen el tripéptido de unión a integrina RGD (39).



**Figura 3.** La familia SIBLING se define por la estructura de sus exones. OPN: osteopontina, BSP: sialoproteína ósea, DMP1: proteína de matriz dentinaria-1. DSPP: fosfoproteína dentinaria, MEPE: fosfoglicoproteína de la matriz extracelular (39).

La familia de proteínas SIBLING comprende 5 proteínas: la fosfoproteína dentinaria (DSPP), la proteína de matriz dentinaria-1 (DMP-1), la osteopontina (OPN), la fosfoglicoproteína de la matriz extracelular (MEPE) y la sialoproteína ósea (BSP). Dentro de este grupo de proteínas se han descrito dominios intrínsecamente desordenados que corresponden entre el 50 al 80% del total de su secuencia de aminoácidos (1, 4, 5).

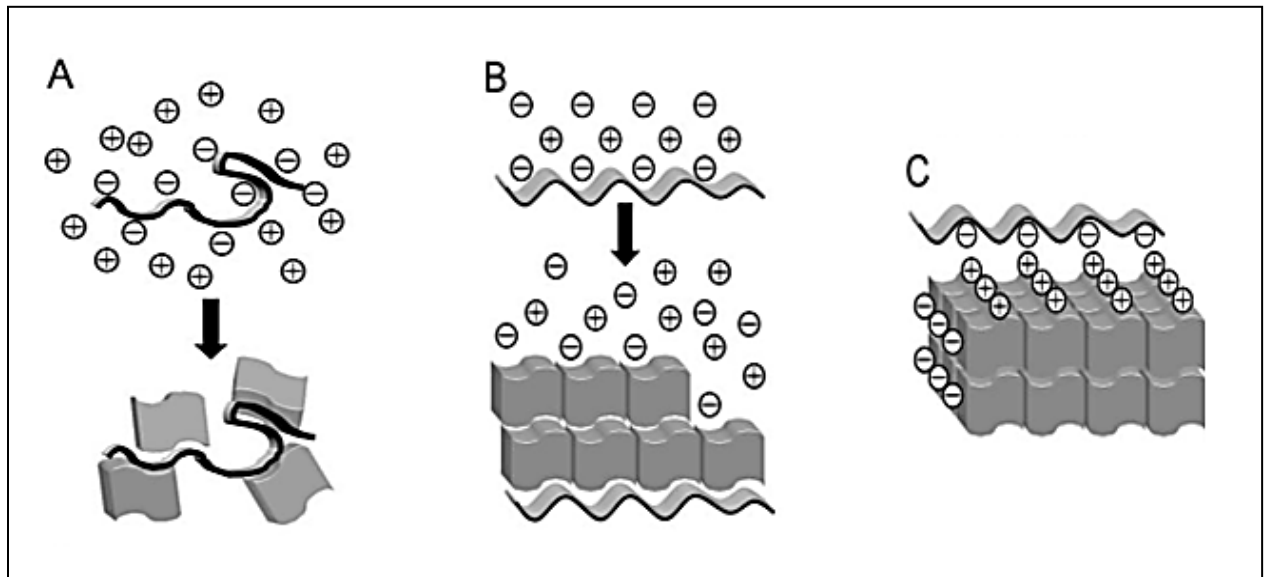
Las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) son proteínas que se caracterizan por no presentar una estructura tridimensional definida bajo condiciones fisiológicas y mantener una estructura del tipo al azar o desordenada, no asumiendo una típica estructura secundaria ( $\alpha$ -hélice u hoja- $\beta$ ). Las IDPs son por lo general hidrofílicas, frecuentemente con dominios cargados negativa o positivamente. Una característica común en las IDPs es el gran contenido de aminoácidos ácidos, como ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D), así como gran número de aminoácidos fosforilados, como fosfoserina (pS), fosfotirosina (pY) y fosfotreonina (pT).

Estos residuos se agrupan en múltiples dominios o tripletes repetidos en su secuencia como: ácido aspártico-serina-serina (DSS) o ácido glutámico-serina-serina (ESS), donde la serina es a menudo fosforilada con diversas combinaciones posibles (DpSpS, EpSpS) y aún no exploradas en su función. Asimismo, otra característica importante es que las IDPs no cumplen con el paradigma estructura-función clásica, de esta manera su flexibilidad les permite tener distintos ligandos y por ello cumplir con múltiples funciones. Además, pueden sufrir transiciones estructurales del desorden al orden al unirse a alguno de sus ligandos (colágeno, HA, calcio, entre otros). Se ha reportado que estas proteínas representan aproximadamente el 30% del proteoma (9,10). Recientemente han comenzado a ser estudiadas en profundidad debido a que se han relacionado con importantes funciones biológicas como la regulación de la expresión génica, corte y empalme del RNA, así como regulación de modificaciones postraduccionales de las proteínas, apoptosis, incluso se han asociado a patologías como la esquizofrenia y el Alzheimer (7, 8, 40).

En la biomineralización se ha demostrado que la mayoría de las proteínas que participan en la formación del cristal de HA son IDPs, con contadas excepciones de proteínas con estructuras tridimensionales como las fibras de colágena, osteocalcina, fosfatasa alcalina (ALP), y osteonectina (4). Se ha observado que una gran cantidad de proteínas IDPs promueven la formación inicial de HA, controlan su crecimiento e inhiben su formación en momentos precisos (2, 3). La naturaleza flexible y elongada de las IDPs les permite tener mayor superficie para poder controlar la estructura y morfología de los cristales de HA. La proteína DSPP es escindida por la acción de una

proteasa en dos productos altamente desordenados conocidos como la sialoproteína de la dentina (DSP) y la fosforina (DPP). Se ha demostrado también que el miembro de la familia SIBLING, BSP, es una proteína desordenada, y que DMP1 tiene transiciones del desorden al orden cuando se une a sus ligandos colágeno,  $\text{Ca}^{2+}$  y HA (8, 9). Se ha observado que las estructuras flexibles de las IDPs tienen cambios en su estructura secundaria al estar fosforiladas, al unirse al  $\text{Ca}^{2+}$  y a la HA (5). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el que las IDPs pertenecientes a la familia SIBLING participan en el proceso de biomineralización, la forma en que interactúan con la MEC y con sus componentes fundamentales como colágeno y HA.

Aunque los mecanismos de acción exactos de las proteínas SIBLING aún no están claros, diversos estudios han proporcionado información valiosa sobre la manera en la que pueden interactuar con los minerales (32, 41-43), y se han propuesto distintos modelos mediante los cuales las proteínas SIBLING pueden mantener la regulación de la mineralización. Los “modelos de regulación de la mineralización” por proteínas ácidas de la MEC proponen 3 formas de interactuar con la interfaz mineral. Como primera propuesta, las proteínas con una estructura al azar pueden inducir la formación *de novo* de cristales atrayendo iones del medio y aumentando la sobresaturación local; sin embargo, de esta forma las proteínas no podrían controlar la orientación de los cristales (Fig. 4A). Otro mecanismo propuesto es que las proteínas al ser altamente flexibles y desorganizadas pueden adquirir una conformación regular y promover así tanto la nucleación como el crecimiento de cristales con una orientación epitaxial (Fig. 4B). Una tercera propuesta indica que la macromolécula proteica puede modificar su forma yendo de una estructura al azar a una estructura con una conformación regular que coincide con ciertos planos cristalográficos, lo que da como resultado la unión preferida de la proteína a alguna o algunas caras del cristal, generando que el crecimiento de los cristales se inhiba en la dirección que interactúa con la macromolécula (Fig. 4C) (32).

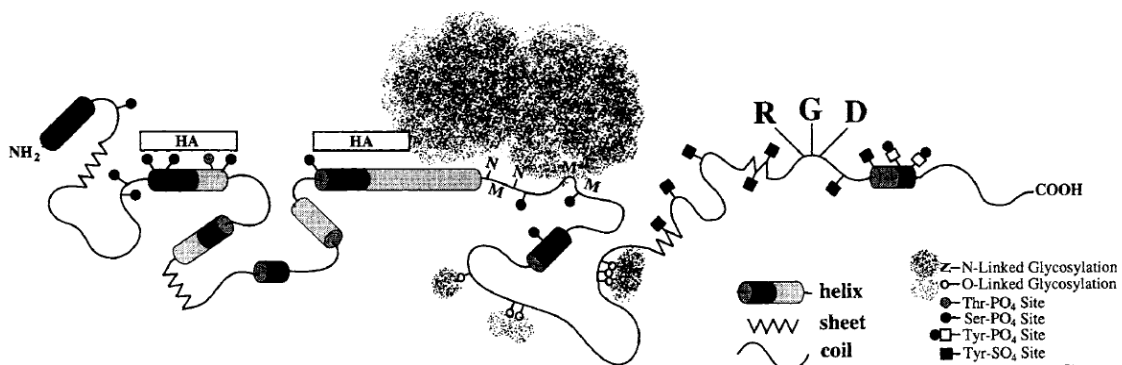


**Figura 4.** Modelos de regulación de la mineralización por parte de las proteínas SIBLING. A) la proteína flexible y desordenada atrae iones del medio induciendo la nucleación. B) el péptido puede adoptar una estructura regular promoviendo la nucleación y el crecimiento del cristal con una orientación. C) el péptido puede adoptar una estructura regular, interactuar con una cara del cristal y regular su crecimiento. Los bloques irregulares representan cristales. Las cintas representan péptidos (32).

Estos modelos permiten apreciar los posibles efectos de las proteínas no colágenas SIBLING sobre la formación de fosfatos de calcio y la importancia que adquieren sus características estructurales para el proceso de la mineralización. No obstante, los mecanismos exactos y las funciones de las proteínas individuales en la mineralización de los tejidos óseos siguen sin estar determinados.

#### 4. Características de la sialoproteína ósea (BSP)

La BSP, miembro de la familia SIBLING y también conocida como sialoproteína ósea-2, es una de las PNC más abundantes. La BSP constituye hasta el 15% de las PNC del hueso humano (15). Fue reportada por primera vez en 1972, y se purificó originalmente a partir de hueso de ternera. El gen de BSP humano (*IBSP*) codifica una proteína de 317 residuos de aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 16 residuos (16). La estructura primaria de la proteína tiene un peso molecular de 33.6 kDa. Debido a su alto contenido de carbohidratos, la BSP purificada de hueso bovino tiene un peso molecular de 59 kDa, mientras que la BSP humana glicosilada tiene ~70 kDa. La BSP es rica en oligosacáridos con un alto contenido de ácido siálico y un alto grado de fosforilación que contribuyen a su carga global negativa. Del centro al extremo amino terminal la BSP es rica en aminoácidos ácidos, donde incluye dos segmentos de ácido poliglutámico, serinas y treoninas que tienen el potencial de ser fosforiladas, y una región con glicosilaciones, mientras que en su porción más próxima al extremo carboxilo terminal posee una serie de tirosinas que pueden ser sulfatadas o fosforiladas, así como una secuencia RGD, región de unión a integrina (Fig. 5) (17).



**Figura 5** Representación esquemática de la sialoproteína ósea. HA: Hidroxipatita. RGD: tripéptido de unión a integrina (17).

Mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* se analizaron distintos tejidos humanos de fetos de entre 14-17 semanas. Dichos tejidos fueron tomados de costillas,

calvaria, huesos largos de las extremidades, placentas y una variedad de tejidos blandos (tejido ocular, tendón, piel, músculo esquelético, riñón, pulmón) obtenidos de procedimientos terapéuticos. Se determinó que durante el desarrollo del hueso tanto la proteína BSP como su RNAm se encuentran principalmente en el esqueleto, en los condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento, en un subconjunto de osteoblastos al inicio de la mineralización de la matriz y en los osteoclastos. Fuera del esqueleto, la BSP se expresa en odontoblastos, estando así presente principalmente en tejido mineralizado. Aunque ni la proteína ni el ARNm se identificaron en tejidos no conectivos, también se encontró presente en el trofoblasto (44). Al igual que los resultados en humanos, estudios en ratones han mostrado que el RNAm de BSP es detectable en osteoblastos de huesos embrionarios y en osteocitos recién formados, lo que indica que la transcripción del gen *IBSP* se induce con la diferenciación de osteoblastos y que sus altos niveles de expresión están asociados con la formación temprana de la matriz mineralizante (12, 13).

Debido a la aparente participación de la BSP en el inicio de la mineralización, sus efectos en soluciones de calcio y fósforo se determinaron mediante el uso de un sistema de gel de agarosa en estado estacionario, con lo que Hunter (1993) demostró que BSP estimula la formación de cristales de HA (18). Sin embargo, la función precisa de BSP aún no se comprende completamente, en gran parte debido a la falta de información experimental sobre la estructura de BSP a nivel atómico, tanto de la proteína en solución como manteniendo interacciones con los componentes de la MEC, como con la superficie de cristales de HA (19).

Una de las razones que ha dificultado su estudio es la presencia de regiones intrínsecamente desordenadas (IDR). Mediante la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) unidimensional se concluyó que BSP tiene una estructura flexible en solución, sin regiones estructurales significativas (5). Utilizando la técnica de microscopía electrónica, Franzen y Heinegård describieron a la BSP purificada de hueso bovino como una varilla extendida con un núcleo, con una longitud media de 40 nm (45). Sin embargo, los resultados de la espectroscopia por dicroísmo circular (DC) reportados por Wuttke y col. para la proteína BSP recombinante muestran una



estructura globular con un diámetro de 10 nm que está unido a una estructura en forma de hilo de aproximadamente 25 nm de longitud. Adicionalmente, el análisis de los espectros de DC revelaron una estructura con 5% de  $\alpha$ -hélice, 32% de lámina  $\beta$ , 17% de giro  $\beta$  y 46% de estructura aleatoria para BSP (46).

Caracterizar de manera experimental la estructura de una IDP es difícil, razón por la cual muchas proteínas en el Protein Data Bank (PDB) presentan regiones faltantes. Mediante estudios de estructuras por rayos X, las regiones no observadas se deben a que los residuos no dispersan los rayos X de manera coherente debido a la variación de posición de los átomos en zonas flexibles o que están desordenados, obteniendo resultados de baja resolución. Asimismo las IDP's carecen de la capacidad de ser cristalizadas, por lo que no pueden ser analizadas mediante técnicas cristalográficas ampliamente usadas como la cristalografía de rayos X (47). Adicionalmente, el tamaño de la BSP supera el límite de resolución de la RMN tradicional, 25 kDa (48). Las proteínas no estructuradas deben estudiarse mediante múltiples métodos biofísicos para poder obtener una comprensión más completa de sus características, lo que puede requerir una alta inversión de recursos económicos y de tiempo. Por estas razones, los enfoques bioinformáticos para deducir las propiedades de proteínas que contengan regiones IDPs se han convertido en los métodos preferidos para su identificación y caracterización estructural (49-51).

Existen estudios de simulación de dinámica molecular (SDM) que complementan resultados experimentales y amplían los conocimientos sobre las posibles interacciones de la BSP. Vincent y Durrant en 2013 lograron demostrar mediante SDM que ciertas secuencias de BSP tienen la capacidad de atrapar iones  $\text{Ca}^{2+}$ , de unirse al colágeno tipo I y de interaccionar con los cristales de HA (52). Sin embargo, la naturaleza de sus interacciones, mecanismos y cambios conformacionales no son completamente esclarecidos.

A partir de estudios de SDM realizados en el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos con distintos péptidos de la proteína BSP se lograron identificar regiones posiblemente involucradas en el proceso de nucleación de HA dentro de la secuencia primaria que corresponden a péptidos de los residuos 4-23, 24-54, 55-83 (datos no publicados).

Dichas regiones se ubican en el extremo amino terminal, altamente conservado en mamíferos (17), y poseen una secuencia primaria con carga predominantemente negativa, lo que se respalda por resultados de dinámica molecular que plantean la importancia de las regiones con carga dentro de una proteína para mantener una fuerte interacción con los cristales de HA (52, 53).

Gracias a sus características estructurales como IDP, a su localización casi exclusiva en esqueleto y órganos dentarios en etapas embrionarias y a su capacidad de nuclear la formación de cristales de HA *in vitro*, la BSP se señala como un posible punto de control en el proceso de formación del tejido mineralizado. Debido a que las interacciones proteína-ion y proteína-superficie mineral desempeñan un papel esencial durante el proceso de biomineralización y subsecuente formación del tejido óseo, estudiar este mecanismo es de fundamental importancia biomédica. Por ello, dilucidar dichas interacciones podría ayudar a comprender los mecanismos mediante los cuales la BSP participa en la formación del tejido óseo.

## **5. Simulación de dinámica molecular (SDM)**

La SDM es un tipo de técnica empleada en las simulaciones computacionales que permite estudiar sistemas a nivel atómico analizando su comportamiento a través del tiempo. Su principio básico es el cálculo de las fuerzas entre los átomos constituyentes del sistema mediante la resolución de las ecuaciones de movimiento de Newton (54, 55).

Mediante esta técnica es posible analizar distintos sistemas biológicos, tales como las proteínas. Consideradas como macromoléculas intrínsecamente dinámicas, los movimientos de dichas macromoléculas cubren un amplio rango de magnitud y de tiempo. Estos movimientos tienen un papel funcional, por lo que las simulaciones de dinámica molecular adquieren gran relevancia en la comprensión tanto funcional como estructural de diversos sistemas biológicos (56).

La utilización de la dinámica molecular posibilita el estudio de cambios conformacionales de un receptor y su ligando, o los sitios de interacción específicos entre macromoléculas peptídicas con ligandos de interés, lo que resulta crucial en el diseño de nuevos fármacos y es importante para el entendimiento de los mecanismos de acción. Además permite estudiar la estructura tridimensional de proteínas con regiones intrínsecamente desordenadas que son difíciles de estudiar mediante técnicas experimentales, el paso de moléculas a través de membranas celulares, solubilidades, entre muchas otras cosas (49,57,58).

Para realizar simulaciones de dinámica molecular se requiere del conocimiento de la energía del sistema. La energía está definida por un grupo de funciones de interacción y parámetros conocidos como “campos de fuerza”. Dicho campo describe la dependencia de la energía de un sistema a las posiciones de sus partículas  $U(r)$ . La energía potencial en mecánica molecular considera términos de enlace para interacciones de átomos que están vinculados mediante enlaces covalentes y términos de no enlace que describen las fuerzas electrostáticas y fuerzas de Van der Waals de largo alcance (59).

$$U_{\text{Total}}(r) = U_{\text{Covalentes}}(r) + U_{\text{No covalentes}}(r)$$

(1)

Donde las energías potenciales covalentes están dadas por:

$$U_{\text{Covalentes}}(r) = U_{\text{Enlace}}(r) + U_{\text{Ángulo}}(r) + U_{\text{Diédricos}}(r)$$

(2)

Y las energías no covalentes:

$$U_{\text{No covalentes}}(r) = U_{\text{Electroestatica}}(r) + U_{\text{van der Waals}}(r)$$

(3)

Así, los átomos se consideran como masas puntuales y la energía potencial del sistema se divide en varias contribuciones:

$$U_{\text{Total}}(r) = U_r(r) + U_\theta(r) + U_\phi(r) + U_q(r) + U_{vdW}(r) + U_{accp}(r)$$

(4)

Donde:

- $U_r(r)$  es la energía de tensión de los enlaces. Se considera cada enlace como un resorte con una distancia de equilibrio y una constante de elasticidad, cuyos valores dependen del tipo de enlace del que se trate.
- $U_\theta(r)$  es la energía de flexión. Dos enlaces con un átomo en común forman un ángulo, que tiene el valor de equilibrio y una constante de rigidez.
- $U_\phi(r)$  es la energía de torsión. En una interacción de cuatro átomos enlazados consecutivamente se pueden identificar dos ángulos, cada ángulo define un plano y los planos formados por dos ángulos que comparten un enlace forman un ángulo de torsión o ángulo diedro.
- $U_q(r)$  es la energía de la interacción electrostática. A cada átomo se le asigna una carga  $q$  y la interacción total se obtiene.
- $U_{vdw}(r)$  es la energía de van der Waals, que incluye la repulsión electrostática y las interacciones de dispersión entre los distintos átomos. Generalmente se modela mediante un potencial de Lennard-Jones.

-  $U_{\text{acop}}(r)$  es la energía de acoplamiento entre los términos anteriores, que viene dada por términos cruzados que implican distintas distancias o ángulos(59).

De esta manera la energía total del sistema de interés será:

$$\begin{aligned}
 U(r) = & \frac{1}{2} \sum_{\text{bounds}} K_b(b - b_0)^2 \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{\text{bound angles}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{\text{torsional}} K_\phi[1 + \cos((n\phi - \delta))] \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{\text{nb pairs}} \left( \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} + \frac{q_1 q_2}{Dr} \right)
 \end{aligned}$$

(5)

Como se mencionó anteriormente  $U(r)$  es la energía del sistema en función de las coordenadas  $r$ , las cuales especifican las posiciones de los átomos, a partir de estas se calculan las coordenadas individuales para las longitudes de enlace, ángulos de enlace, ángulos diedros y distancias entre partículas (60).

La primera parte de la ecuación corresponde a los desplazamientos de la longitud de enlace ideal,  $b_0$  representa el potencial armónico (ley de Hooke). Dicho potencial es una aproximación a la energía de un enlace en función de su longitud. Siendo  $K_b$  la constante de Hooke que determina la flexibilidad. El segundo término también representa un potencial armónico, para las rotaciones sobre los enlaces se utilizan las funciones de potencial de ángulo de torsión que están dadas por el tercer término de la ecuación. Suponiendo que este potencial es periódico y está modelado por un coseno o sumas de funciones coseno. El cuarto termino representa la contribución de las interacciones no vinculadas y está constituida por tres partes; un término repulsivo para

evitar que los átomos intercalen a distancias cortas, un término atractivo que explica las fuerzas de dispersión de London entre átomos y un término electroestático repulsivo o atractivo dependiendo de las cargas de  $q_1$  y  $q_2$  (si tienen el mismo signo es repulsivo y si tienen distintos signos se atraen). Los dos primeros términos no vinculados se combinan para dar el potencial familiar de Lennard-Jones(59, 60).

Las simulaciones parten del conocimiento de la energía del sistema en función de las coordenadas atómicas  $U(r)$ . A partir de esta energía podemos calcular la fuerza mediante:

$$\vec{F}_i = -\vec{\nabla}U_i(r)$$

(6)

Siendo  $F_i$  todas las fuerzas que interactúan en un sistema de  $i$  partículas, se utiliza el gradiente ( $\nabla$ ) como un operador que actúa sobre el potencial, y  $U_i(r)$  como la energía del sistema. Cuando el operador actúa sobre la energía se obtienen las derivadas parciales con respecto al sistema de coordenadas  $(x,y,z)$  y posteriormente resuelve de manera numérica dichas ecuaciones utilizando las ecuaciones de movimiento de Newton.

$$\vec{F}_i = m\vec{a}_i$$

(7)

Despejando:

$$\frac{\vec{F}_i}{m} = \vec{a}_i$$

(8)

Existen muchos métodos para la resolución de las ecuaciones diferenciales obtenidas, el algoritmo que utiliza la paquetería de GROMACS es el integrador “leap frog”. El algoritmo utiliza las ecuaciones:

$$v(t + \frac{1}{2}\Delta t) = v(t - \frac{1}{2}\Delta t) + \frac{\Delta t}{m}F(t)$$

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v(t + \frac{1}{2}\Delta t)$$

(9)

Con  $r$  como las posiciones,  $t$  el tiempo,  $v$  las velocidades y  $F(t)$  como las fuerzas dependientes del tiempo. Al inicio son calculadas las velocidades al tiempo  $t + 1/2\Delta t$ , una vez calculadas son utilizadas para calcular las posiciones al tiempo  $t + \Delta t$ , de esta manera surge el nombre del algoritmo, ya que el cálculo de las posiciones “salta” a las velocidades y posteriormente de las velocidades “salta” a las posiciones.

La simulación de dinámica molecular, con fines prácticos, se puede dividir en 5 etapas:

1. Configuración del sistema: En este primer paso se establece o elige la configuración inicial a utilizar, compuesta de  $N$  átomos, y se definen las condiciones de equilibrio mediante el campo de fuerza (54).
2. Minimización de energía: Dado que el sistema fue creado de forma computacional, puede ser que la configuración inicial permita interacciones atómicas que normalmente no ocurren en la naturaleza, como la sobreposición de átomos, lo que lleva al sistema a tener una alta energía. Para eliminar estos contactos no nativos, se utilizan algoritmos que permiten establecer la conformación de menor energía de proteínas, ADN o moléculas pequeñas (según sea el caso de estudio), llevando al sistema a una optimización de la geometría. Este paso es importante debido a que si la configuración del sistema se encuentra muy lejos del estado de mínima energía, las fuerzas pueden ser excesivamente grandes y la SDM puede fallar (54).
3. Equilibración: Se realiza mediante diferentes esquemas o ensambles de simulación (microcanónico, canónico, isotérmico-isobárico). Se lleva el sistema al equilibrio para que el número de partículas, volumen, presión y temperatura

permanezcan constantes. En este paso se pueden definir las condiciones que se quieren mantener invariantes (54).

4. Producción: Se define el tiempo de ejecución y se ejecuta la dinámica molecular. Este es el paso que requiere mayor tiempo, ya que se puede ordenar una simulación que puede ir desde pocos ps a ns de dinámica molecular pero que en tiempos computacionales puede requerir de horas o hasta varias semanas. En este paso se realiza el cálculo de fuerzas del sistema con lo que se pueden obtener las propiedades fisicoquímicas de interés (54).
5. Análisis de datos: Es posible obtener información sobre numerosos parámetros del programa que se emplee para desarrollar la SDM; adicionalmente se puede seguir y analizar la trayectoria o comportamiento del sistema ante distintas condiciones, mediante la obtención de una animación o película. Esto es posible por medio de visualizadores moleculares con interfaz gráfica como VMD (Visual Molecular Dynamics) o PyMOL (54, 61).

Existen distintos programas para realizar SDM; uno de ellos es GROMACS (del acrónimo *Groningen Machine for Chemical Simulation*), el cual es un paquete de programas que permite simular las ecuaciones de movimiento de Newton, y es compatible con otros programas para el análisis de simulaciones. GROMACS es útil para simular sistemas con cientos a millones de partículas (54, 61).



## JUSTIFICACIÓN

La sialoproteína ósea (BSP) es un componente esencial de la matriz extracelular del hueso, cuya función se ha asociado con la formación *de novo* de los tejidos mineralizados. Aunque se desconocen sus mecanismos de acción se ha demostrado que la BSP tiene la capacidad de nuclear e interaccionar con los cristales de hidroxiapatita (HA). Sin embargo, sus dominios de unión, la naturaleza de sus enlaces y los arreglos moleculares que adquiere la BSP siguen sin esclarecerse.

Para comprender ciertas funciones de una proteína es importante estudiar sus características estructurales durante la interacción con sus ligandos. La simulación de dinámica molecular (SDM) es una herramienta que nos brinda la opción de obtener un modelo atómico y realizar la exploración funcional de proteínas que carecen de una estructura tridimensional ordenada, como es el caso de la BSP.

Dilucidar mediante un modelo *in silico* las interacciones proteína-ion y proteína-superficie mineral que podría tener el péptido 4-23 de BSP nos ayudará a comprender los mecanismos mediante los cuales la BSP podría interactuar con los cristales de HA y participar en la formación del tejido óseo. Asimismo, la SDM podría apoyar al diseño de secuencias peptídicas que presenten un potencial terapéutico en diversas aplicaciones de importancia biomédica como la regeneración ósea en la ingeniería de tejidos o en la funcionalización de superficies de implantes que garanticen la osteoformación dirigida.

## HIPÓTESIS

La interacción entre el péptido que comprende los aminoácidos 4-23 de la BSP y el cristal de hidroxiapatita se establece mediante uniones electrostáticas, favorecidas por una estructura al azar y una secuencia primaria con carga predominantemente negativa.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar *in silico* la interacción entre el péptido 4-23 de la sialoproteína ósea con los cristales de hidroxiapatita.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar los cambios estructurales del péptido comprendido entre los residuos 4-23 de la sialoproteína ósea en ausencia y presencia del cristal de hidroxiapatita.
2. Identificar la interacción molecular de la región comprendida entre los residuos 4-23 de la sialoproteína ósea con su ligando fisiológico hidroxiapatita.

## METODOLOGÍA

### 1. Simulación de dinámica molecular

Se realizaron distintas SDM con la paquetería de software GROMACS (GRONingen Machine for Chemical Simulation) versión 4.5.3 (61). Se investigó un péptido extraído de la secuencia de BSP humana, que se muestra en la Tabla 1. El péptido se modeló en la conformación extendida para observar sus cambios en estructura secundaria y se le añadió en sus extremos terminales los grupos acetilo (Ace) y amino (NH<sub>2</sub>) para evitar interacciones de los grupos amino y carboxilo, usando el programa PyMol (62). Estructuralmente, la HA pertenece al grupo espacial P6<sub>3/m</sub> y cristaliza en un sistema hexagonal con parámetros de la celda unitaria  $a = 9.424 \text{ \AA}$ ,  $b = 9.424 \text{ \AA}$ ,  $c = 6.853 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$ . Se modelaron superceldas de HA de acuerdo con Mostafa et al. (63), usando el programa GULP (64) para optimizar la geometría.

Se construyeron cajas virtuales rectangulares con las dimensiones 5.6 nm x 6.8 nm y 8.9 nm. El péptido individual se dispuso en el centro de la caja, mientras que el péptido con HA se orientó paralelamente a la cara del cristal (100), estableciendo una distancia

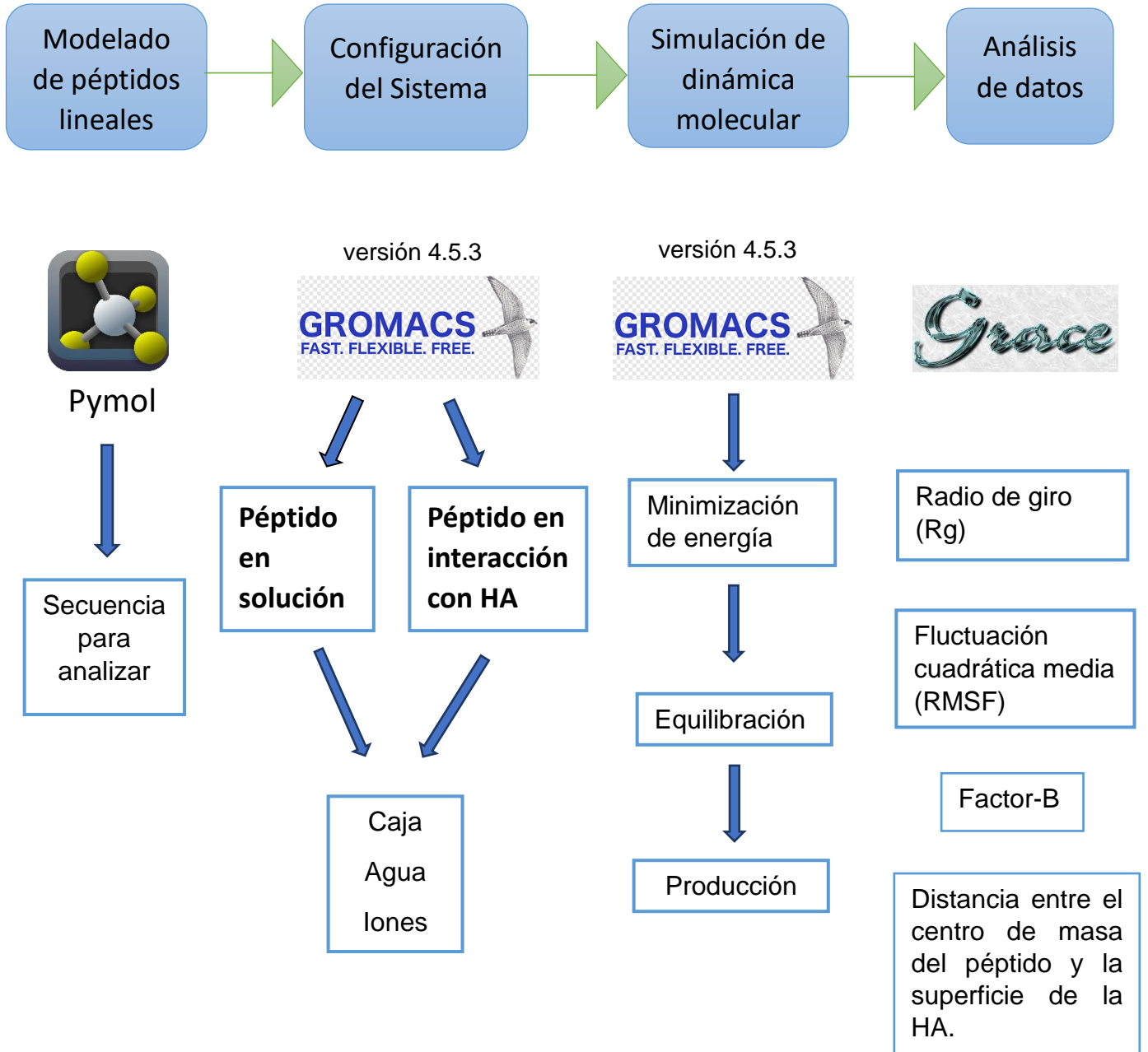
entre la hojuela de HA y el péptido de 3 nm. Cada sistema se solvató con el modelo de agua de carga puntual simple (SPC).

Los cálculos de SDM se realizaron con el campo de fuerza GROMOS96 43a1p complementado con parámetros para HA (65). Para obtener una carga neutra del sistema se agregaron iones ( $Na^+$  o  $Cl^-$ ) de acuerdo con lo requerido por cada sistema. La minimización de energía se realizó mediante la metodología “*steepest descent*” (descenso más pronunciado). La equilibración del sistema se llevó a cabo con el uso de los ensambles de NVT y NPT a 300° K. Las SDM se realizaron en condiciones periódicas y durante un tiempo de 30ns.

Se analizaron cambios en la distancia entre el centro de la masa del péptido y la superficie de la HA, fluctuación cuadrática media (RMSF), radio de giro (Rg) y factor B.

Tabla 1: Péptido investigado				
Nombre	Secuencia	Residuos en secuencia primaria	Número total de residuos	Carga total
<b>Péptido 1 (P1)</b>	Ace-KNLHRRVKIEDSEENGVFKY-NH <sub>2</sub>	4-23	20	-1
El péptido analizado se tomó de la secuencia primaria de BSP humana.				

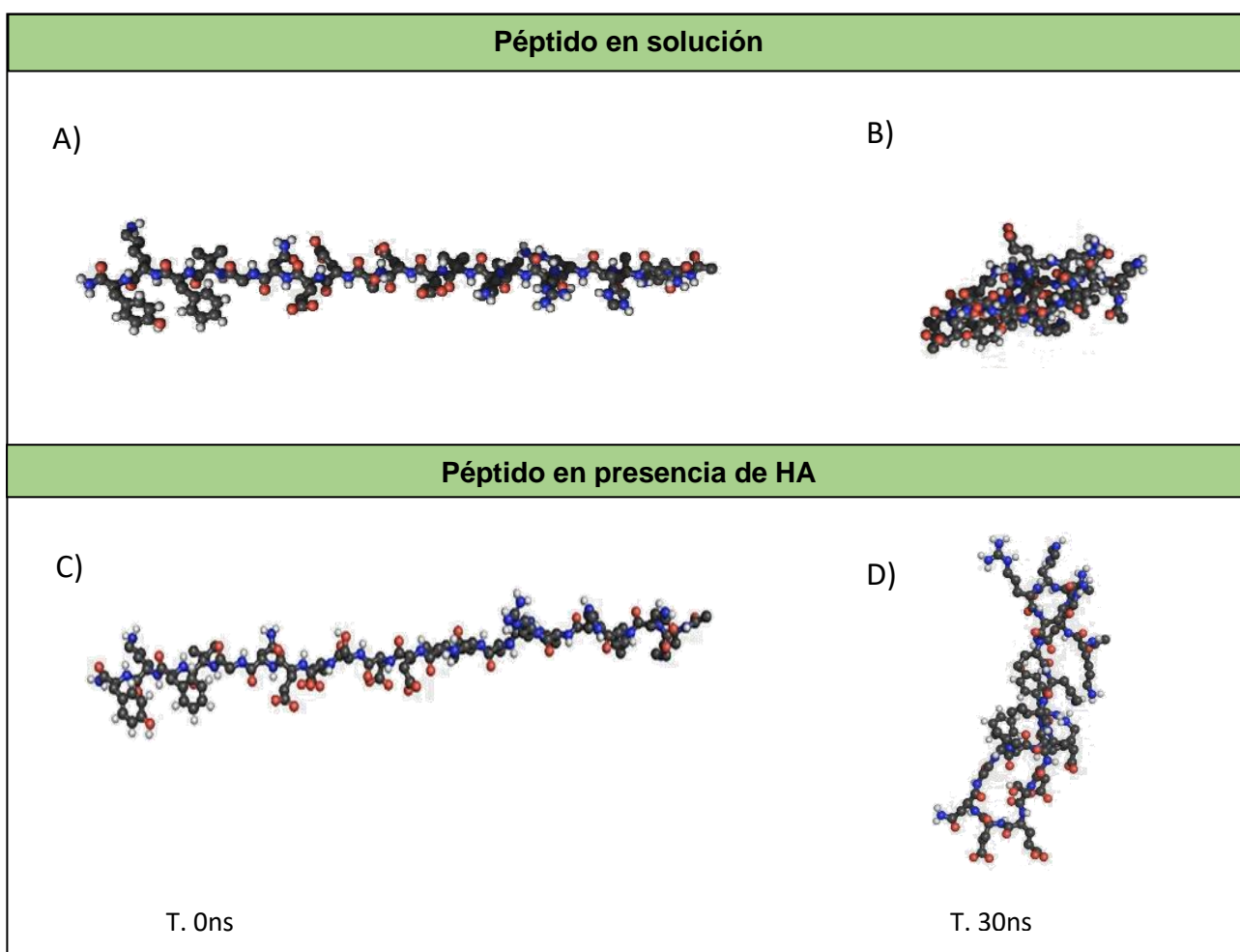
## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## RESULTADOS

El péptido especificado en la Tabla 1 fue modelado en su estructura extendida para observar los cambios conformacionales que puede adquirir a lo largo de la simulación de dinámica molecular, la cual se realizó durante un lapso de 30ns. Los análisis se realizaron bajo dos condiciones distintas; el péptido solo en solución y el péptido en presencia de HA en solución acuosa.

**P1: (Del residuo 4 al 23) Ace-KNLHRRVKIEDSEENGVFKY-NH<sub>2</sub>**



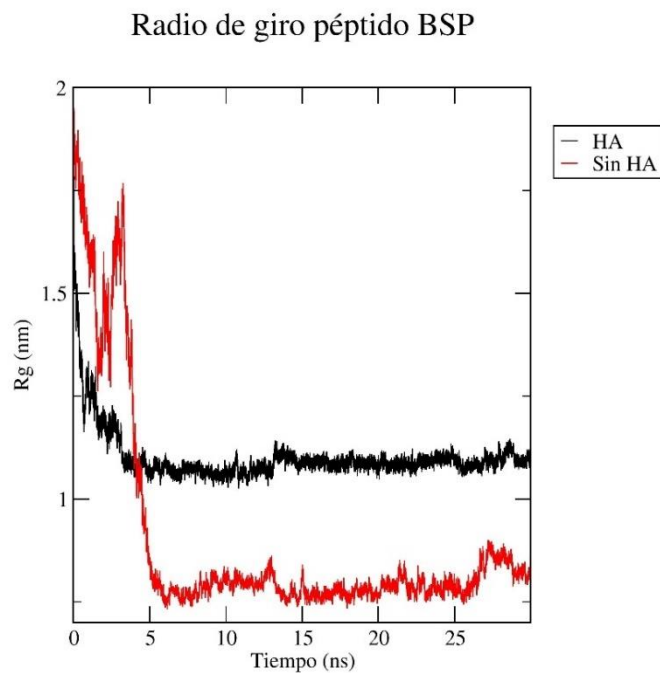
**Figura 6.** Estados estructurales del péptido 1 en simulación de dinámica molecular. La columna izquierda muestra el estado inicial, mientras que la columna derecha muestra las estructuras adquiridas al transcurrir los 30ns de simulación. En A) y B) se observan las estructuras correspondientes a los péptidos solos en solución acuosa. En C) y D) se muestran las estructuras de los péptidos en presencia de HA en solución acuosa.

En la Fig. 6 se muestran imágenes del estado conformacional correspondientes al inicio y al final de la dinámica molecular cuyas trayectorias fueron visualizadas y obtenidas mediante el programa PyMOL. Se puede apreciar también cómo el péptido en solución adquiere una conformación compacta al transcurrir 30ns en interacción con las moléculas de agua y las cadenas laterales de sus aminoácidos constituyentes. En contraste, cuando el péptido está en presencia de HA, éste parece adquirir una estructura en asa y su compactación es mucho menor.

## 1. Radio de giro

El radio de giro ( $R_g$ ) es un parámetro que describe la conformación en equilibrio de un sistema total, funcionando como un indicador de la compactación de una estructura proteica (66). Las variaciones en los  $R_g$  para el péptido en solución y en presencia de HA a lo largo de la simulación se muestran en la Fig. 7.

A partir de la obtención de los valores de  $R_g$  a lo largo del tiempo en que se mantuvo la simulación de dinámica molecular se puede observar que, en presencia de HA, el  $R_g$  para el péptido es mayor ( $\sim 1.1$  nm) con respecto al del péptido que se encuentra solo en solución ( $\sim 0.7$  nm), lo que indica que adquiere una conformación más extendida. Adicionalmente, se puede apreciar que los valores de  $R_g$  se estabilizan a partir de los 5ns tanto en presencia como en ausencia de HA, sin embargo, dicho valor parece ser más estable para el péptido 1 en presencia de la HA, lo que indica que la conformación adquirida se mantiene con muy pocas variaciones durante la simulación, mientras que, los valores de  $R_g$  para el péptido 1 en ausencia de HA muestran ligeras variaciones a lo largo de la SDM, lo que indica que su estructura presenta mayores cambios en cuanto a su compactación, posiblemente debido a una mayor flexibilidad.



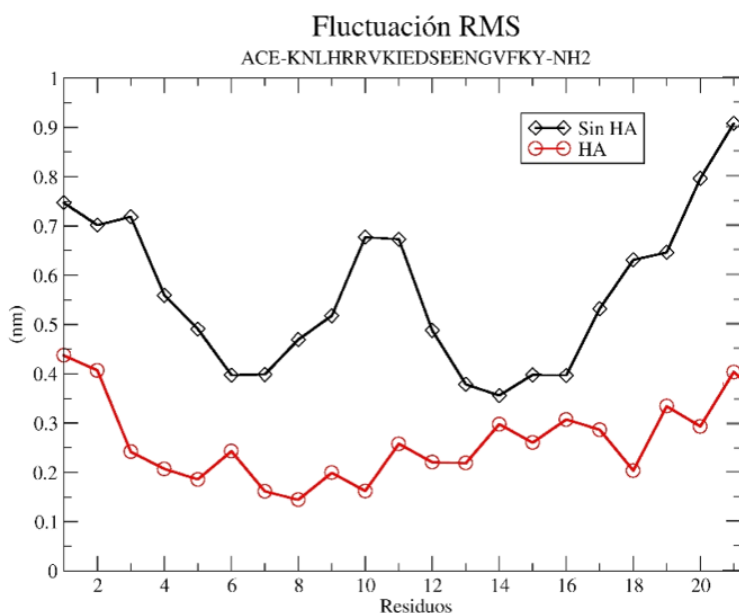
**Figura 7.** Radio de giro ( $R_g$ ) del péptido 1. Se identifican los valores de  $R_g$  en nm a través del tiempo medido en ns. La Línea roja representa el  $R_g$  para el péptido en solución y la línea negra representa el  $R_g$  para el péptido en presencia de HA.

Para comprender el comportamiento en cuanto a la movilidad de cada uno de los aminoácidos que conforman el péptido durante las SDM, se obtuvieron los datos de la fluctuación cuadrática media (RMSF) y del factor B.

## 2. Fluctuación cuadrática media (RMSF)

El valor denominado como RMSF es una herramienta útil para la caracterización de los cambios locales a lo largo de la cadena polipeptídica. Para el presente estudio el RMSF se calculó para los  $C\alpha$  de cada aminoácido. En la Fig. 8 se muestran los resultados del valor RMSF indicando las variaciones de posición para cada residuo a lo largo de la dinámica molecular del péptido, con y sin la presencia de HA en su medio de simulación.

Considerando los valores de RMSF se puede decir, de manera general, que en ausencia de HA el péptido tiene una mayor flexibilidad a lo largo de toda la cadena peptídica en comparación con el péptido en presencia de HA. Sin embargo, en ausencia del cristal HA el péptido presenta internamente dos puntos de menor flexibilidad, entre los residuos 6-7 que corresponden a una arginina y valina respectivamente, y los residuos 13-16 que representan a los aminoácidos ácido glutámico 13, ácido glutámico 14, asparagina 15 y glicina 16. Dichos puntos se presentan en la figura 8 con los valores más pequeños de RMSF dentro del péptido, entre 0.35 a 0.4nm.



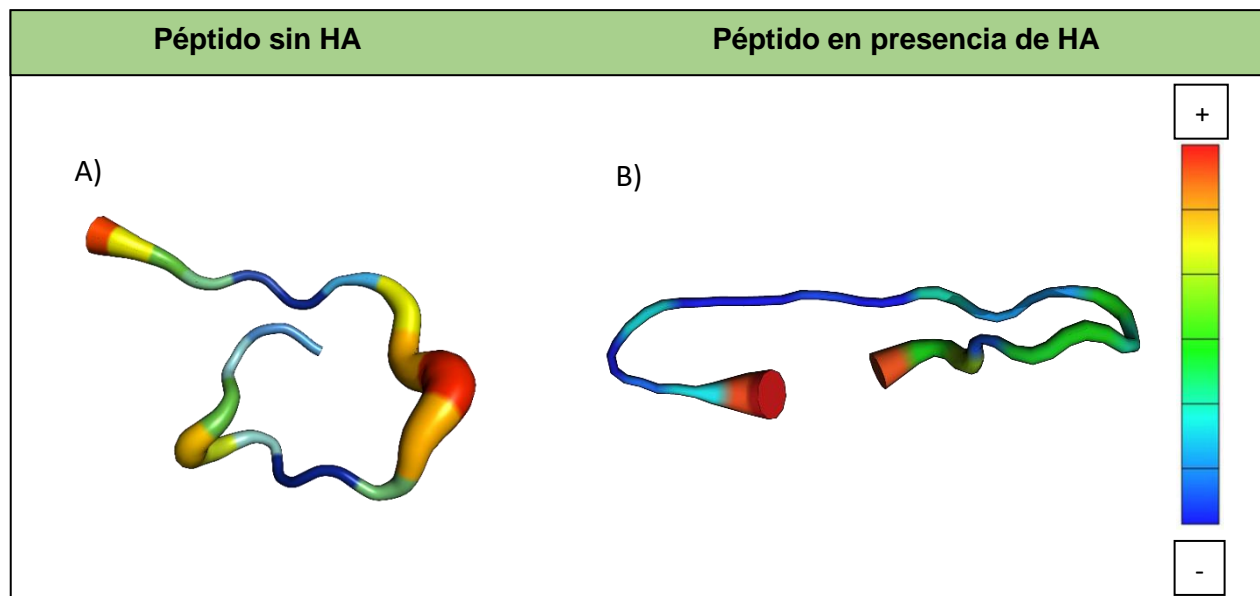
**Figura 8.** Fluctuación cuadrática media (RMSF) del péptido 1. Se identifican los valores de RMSF (nm) frente al número de residuo constituyente del péptido. La línea roja representa el RMSF para el péptido en presencia de HA y la línea negra representa el RMSF para el péptido en solución.

### 3. Factor B

El factor B, en conjunto con el RMSF, ayuda a evaluar la flexibilidad de los péptidos durante una simulación. El factor B representa esquemáticamente la variación de movimientos de los átomos que forman parte del sistema con relación a su posición



promedio. Este valor puede apreciarse en la Fig. 9 la cual contiene las representaciones del factor B para cada sistema de estudio.



**Figura 9.** Factor B del péptido 1. Representación en listón del péptido en solución en ausencia (A) o presencia (B) de HA. La escala de colores indica ascendentemente la variación en la posición de los átomos, del azul al rojo.

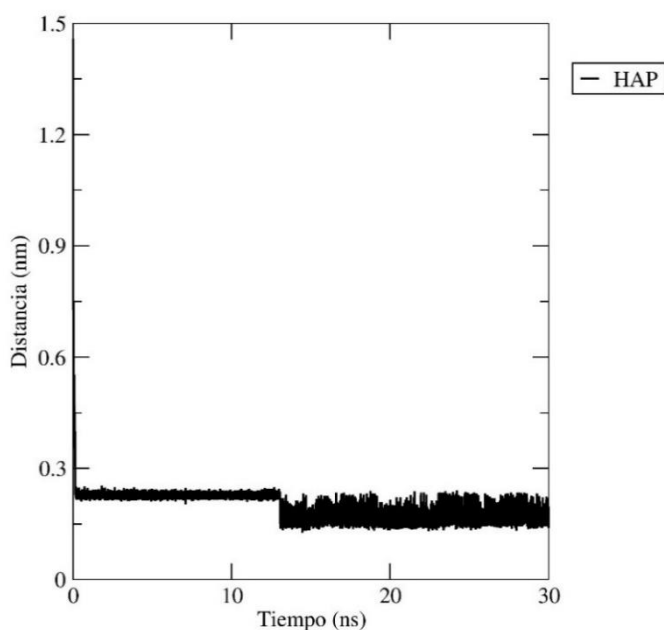
El espectro de colores que presentan los péptidos de las Fig. 9A y 9B es un indicador del grado de rigidez o flexibilidad presente en distintas regiones del péptido, donde el color rojo o naranja se interpretan como la mayor movilidad mientras que el azul se interpreta como la región con mayor rigidez. Asimismo, el grosor mostrado en el “modelo de cinta” guarda relación con la variación de las posiciones de los constituyentes del sistema, siendo las porciones más gruesas las regiones donde el péptido mantiene una mayor flexibilidad. En la Fig. 9 se aprecia que el péptido en solución se mantiene flexible con una mayor variación en las posiciones atómicas de sus residuos, ya que presenta regiones gruesas y escala de colores del amarillo al rojo en gran parte de su estructura. También se puede observar cómo el péptido cuenta con

dos sitios rígidos bien definidos, representados por el color azul marino y menor grosor, en concordancia con los resultados del RMSF mostrados en la Fig. 8.

Otro dato a resaltar es que, en contraste con el péptido en solución (Fig. 9A), el péptido que se encuentra en presencia del cristal de HA (Fig. 9B) adquiere una estructura más rígida, siendo esta rigidez más uniforme a lo largo de la secuencia, excepto por los extremos del péptido donde es evidente un aumento en la variación del movimiento de los átomos.

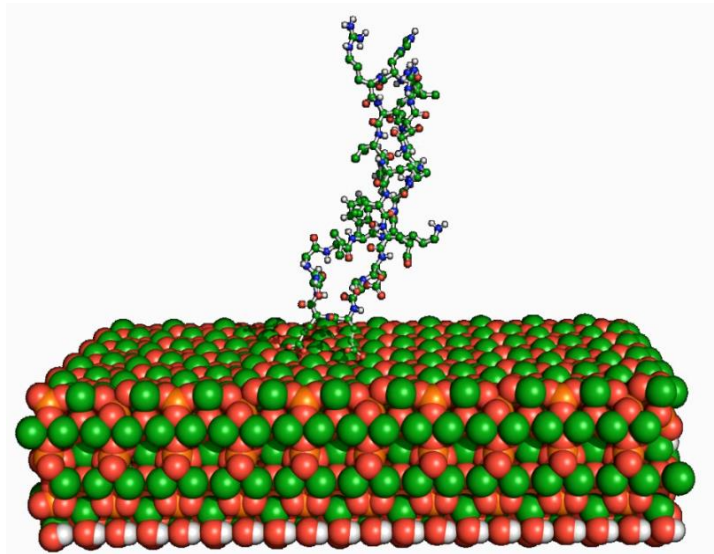
#### 4. Distancia entre el péptido y la hidroxiapatita

Para determinar si el péptido tiene la capacidad de interactuar con HA se midió la distancia que existe entre el centro de masa del péptido y el centro de masa de la HA durante los 30ns en los que se mantuvo la simulación molecular. Los resultados se muestran en la Fig. 10.



**Figura 10.** Distancia entre el centro de masa del péptido 1 y el centro de masa de la HA.

Al obtener la dinámica de la distancia entre el péptido y la HA durante la simulación, se aprecia que el péptido se acerca rápidamente al mineral adquiriendo su posición más próxima a los 11 ns, la cual se mantiene durante el tiempo restante de simulación. Para determinar si el péptido mantiene propiamente una interacción con la HA se visualizó la trayectoria del péptido 1 durante los 30 ns de simulación. Esto fue posible mediante la obtención de una representación en movimiento del sistema (péptido más cristal), observando que el péptido establece y mantiene en todo momento una interacción con el cristal a través de las cadenas laterales de dos de sus aminoácidos constituyentes, tal como se muestra en la Fig. 11. Dichos residuos fueron identificados mediante el programa PyMOL y corresponden al Glu13 y Glu14 del péptido 1, los cuales interactúan con los iones  $\text{Ca}^{2+}$  que forman parte de la estructura externa del mineral de HA.



**Figura 11.** Simulación de la interacción entre el péptido 1 de BSP y la HA.

## DISCUSIÓN

El proceso subyacente a la formación de tejidos que cuentan con una matriz extracelular mineral aún está lejos de comprenderse, sobre todo lo que ocurre a nivel nanoestructural. Sin embargo, se ha conseguido un gran avance en los últimos años gracias a diversos estudios que han ayudado a comprender que la formación de tejidos mineralizados no representa simplemente precipitaciones al azar de los iones calcio y fosfato desde una solución sobresaturada, sino que la biomineralización es el resultado de eventos controlados celularmente que parten de la secreción de una matriz de colágeno y de PNC (21). Aunque se desconocen las funciones exactas de las PNC se acepta ampliamente que participan en la regulación de la mineralización. De manera particular, hay evidencias que sugieren que las PNC pertenecientes a la familia SIBLING pueden influir en la iniciación, el crecimiento y el control de la morfología de los cristales de HA (1, 21, 29).

Si bien se considera que todos los miembros de la familia SIBLING tienen la capacidad de interactuar con HA, las funciones de cada uno de ellos no son bien conocidas. La BSP es una de las proteínas miembro de la familia SIBLING de particular interés, por ser una de las PNC más abundantes en el hueso humano (1). Desde su descubrimiento en 1972 se han dedicado esfuerzos en comprender su función, llevando al descubrimiento de eventos claves como su localización específica en esqueleto y órganos dentarios en etapas tempranas del desarrollo (44), sus características estructurales como IDP (5), su capacidad para nuclear la formación de cristales de HA (18), de mejorar la diferenciación a osteoblastos y de promover la maduración de la MEC ósea *in vitro* (67). Por ello, la BSP se postula como un punto importante de control para que se lleve a cabo la formación del tejido mineralizado, e incluso se utiliza actualmente como un marcador de diferenciación de osteoblastos, siendo de especial interés esclarecer su mecanismo de acción en el tejido óseo y más particularmente en el proceso de biomineralización para la formación de *ново* del tejido (1).

Para comprender el mecanismo de acción de la BSP se requiere conocer, además de sus funciones biológicas, sus ligandos naturales y sus características estructurales, así

como los cambios conformacionales que adquiere para poder interactuar con sus ligandos. Debido a la gran cantidad de estudios que esto requiere, esta investigación se limitó al estudio de las interacciones entre un péptido correspondiente a la región 4-23 de la proteína BSP y la HA. Caracterizar molecularmente la adsorción de proteínas a superficies sólidas es complicado (68), más aún cuando se trata de proteínas con regiones intrínsecamente desordenadas y de gran tamaño, como la BSP (49). Por ello, en el presente trabajo se recurrió a la utilización de la SDM.

El péptido 4-23 representa una de las regiones más conservadas de la proteína BSP en los mamíferos (17). Estudios previos realizados en el laboratorio de Bioingeniería de Tejidos (DEPeI, UNAM) demostraron mediante el predictor PrDOS que la proteína BSP cuenta con un porcentaje de desorden del 66.78%, del residuo 4 al 17, y mediante SDM que el péptido 4-23 tiene la capacidad de interactuar con iones calcio (datos no publicados).

Los resultados derivados del presente trabajo indican, gracias a los valores obtenidos del Radio de giro, que el péptido disminuye su compactación en presencia de la HA con respecto a la estructura que adquiere cuando se encuentra de manera aislada en solución acuosa. Al mantenerse en una conformación más abierta mientras está en contacto con la HA, el péptido adquiere también una mayor rigidez según lo determinado por los valores de RMSF y Factor B. Estos datos concuerdan con los obtenidos en los trabajos realizados por Villarreal-Ramírez et al. (69, 70), en los que estudiaron cinco péptidos de la secuencia primaria de la fosforina dentinaria (DPP), que es uno de los dos productos de escisión de la fosfoproteína dentinaria (DSPP), miembro de la familia SIBLING. Mediante SDM, Villarreal et al. analizaron los cinco péptidos de la secuencia primaria de DPP en solución, en presencia de HA y en estado fosforilado, reportando, según los valores de RMSF y Factor B, un aumento en la rigidez de los péptidos cuando éstos se encuentran en presencia del mineral HA (69, 70).

El aumento en la rigidez del péptido de la BSP puede tener su origen en la forma en que ocurre la asociación entre los constituyentes del péptido y la superficie de HA. Al formarse un complejo entre algunas de las cadenas laterales de los aminoácidos y los

iones expuestos del mineral, puede condicionarse la movilidad de los residuos participantes manteniéndose adsorbidos a una de las caras del cristal, e inducir a la vez la reorganización de los residuos que se encuentran a su alrededor, esto podría tener como consecuencia un descenso en la flexibilidad y la adquisición temprana de una estructura extendida con mayor estabilidad, lo cual sugiere que este péptido tiene gran afinidad por la superficie de la HA.

La conformación de las proteínas es sensible a la naturaleza del medio en el que se encuentran. En particular, se ha observado que la presencia de iones puede estabilizar o desestabilizar la estructura proteica aunque los mecanismos mediante los cuales tiene lugar este fenómeno siguen siendo inciertos (64, 65). Balasubramanian y Misra (71) describieron que un catión metálico al unirse al átomo de oxígeno de una amida provoca una alteración en la geometría de la amida, observando en consecuencia alteraciones en los espectros de los métodos físicos utilizados, como dicroísmo infrarrojo y RMN, en el análisis estructural del péptido ligando. Por tal motivo, un cambio conformacional que lleve al despliegue de la proteína, como en el caso del péptido 1 de la BSP de nuestro estudio, cambia el equilibrio entre el área superficial accesible al solvente (polar) y el no accesible, lo que determina la unión o exclusión de iones (72). Esta conformación extendida proporciona una amplia superficie de unión, siendo especialmente conveniente para interactuar con una mayor área superficial de la red cristalina de HA. En las proteínas IDPs la conformación extendida y elongada, en combinación con el carácter ácido, facilita las interacciones con los contraiones. Esta unión a contraiones presentes en el mineral puede permitir la transición de una estructura en desorden a una de mayor orden (73), lo cual nos habla de la gran capacidad que tiene este péptido de encontrar un orden en su ligando.

Un análisis más preciso de la interacción entre el péptido 1 de BSP y HA, indica que el péptido mantiene una interacción con el cristal a través de las cadenas laterales de Glu13 y Glu14, los cuales corresponden al Glu16 y Glu17, respectivamente, de la secuencia primaria de BSP. Dicha interacción hace que el péptido se pliegue formando un asa donde los Glu mencionados se orientan hacia la HA, siendo atraídos por los iones  $\text{Ca}^+$  que se encuentran expuestos en la superficie. Esta interacción entre

residuos con cargas contrarias ocurre rápidamente y se mantiene de manera estable a lo largo de la simulación. Nuevamente, los resultados obtenidos concuerdan con los resultados mostrados por Villarreal et al. (69), cuyos experimentos *in silico* reportan que, para los péptidos no fosforilados, los aminoácidos ácidos presentan una atracción electrostática donde sus cadenas laterales están orientadas hacia la HA.

Tanto los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación como los reportados por Villarreal et al. (69) se refuerzan con los resultados de Hunter y Golvert (53), quienes mostraron experimentalmente que el bloqueo de las cadenas laterales de los residuos ácidos dentro de la secuencia primaria de BSP inhibía la nucleación de los cristales de HA. Este es el primer indicio de que las secuencias de ácido glutámico son esenciales para la función de la proteína ácida BSP en la regulación de la biomineralización, tanto en el proceso de la nucleación mineral (53) como en la interacción directa con la HA como se sugiere en el presente trabajo.

Sin embargo, resulta interesante destacar que a diferencia de la BSP en donde los residuos ácidos son predominantemente ácidos glutámicos, en la DPP los residuos ácidos son principalmente ácidos aspárticos. Investigaciones que se han centrado en analizar los efectos individuales de los aminoácidos sobre la formación, la morfología o transformación de la HA han demostrado que pueden jugar un papel diferente en la regulación del evento de mineralización (74). Por ejemplo, Matsumoto et al. demostraron que al adicionar glicina (G) en una solución donde se está llevando a cabo la nucleación de HA, la formación de cristales ocurre en forma de varilla unidimensional, mientras que al adicionar ácido glutámico (E) resultan cristales bidimensionales con forma de placa (74, 75). Este efecto diferente que pueden tener los aminoácidos podría ser la razón del por qué proteínas como la DPP y la osteopontina a pesar de ser estructuralmente muy similares a la BSP y de pertenecer a la familia SIBLING, cumplen con funciones diferentes.

La BSP actúa promoviendo la formación de cristales de fosfato cálcico además de mantener interacciones con el cristal, mientras que la osteopontina y la DPP (que se constituyen principalmente de ácido aspártico) inhiben la nucleación y bloquean el crecimiento al interactuar con la red cristalina, respectivamente (76, 77). La principal

diferencia estructural entre el ácido aspártico y el ácido glutámico es que este último contiene un grupo metilo extra en su cadena lateral, lo que podría proporcionar un espacio adecuado de los grupos carboxilos para atraer y propiciar la unión de iones dando lugar a la nucleación. De esta manera las proteínas podrían modificar la morfología y la estructura cristalina de HA debido a los efectos electrostáticos y estereoquímicos de sus residuos. Adicionalmente, los resultados obtenidos del Rg concuerdan con los de Vincent y Durrant (52), quienes propusieron que el extremo amino terminal de la BSP en solución puede adquirir una conformación compacta y globular (como sucede con el péptido 1 analizado), mientras que el extremo carboxilo terminal permanece con una conformación extendida. Asimismo, propusieron que la BSP podía mantener interacciones con el cristal de HA preformado mediante la región del extremo amino terminal. Sin embargo, se necesita realizar más estudios para poder determinar el comportamiento de la proteína total.

Con los resultados obtenidos a partir de un péptido lineal, sin modificación postraducciona alguna, se puede apreciar cómo las propiedades químicas de los aminoácidos tienen la capacidad de determinar el plegamiento de la proteína, la estabilidad de la estructura y la actividad biológica de la macromolécula. No obstante, es importante conocer también las implicaciones que las modificaciones postraduccionales podrían tener en la estructura de la BSP en solución y en relación con sus ligandos. Por ejemplo, diversos estudios han demostrado que las fosforilaciones en proteínas pertenecientes a la familia SIBLING podrían influir tanto en la configuración estructural como en la interacción con sus moléculas dianas (63, 73).

Una de las pocas modificaciones postraduccionales comprobadas experimentalmente para la BSP es la fosforilación en la Ser15 (78), por lo que sería interesante evaluar el comportamiento del péptido 1 al estar fosforilado en dicho residuo. Al ser Glu16 y Glu17 los que logran unirse a la HA, se esperaría una interacción más fuerte si la Ser15 se encontrara en un estado fosforilado (pS), ya que esto dotaría al péptido de una región más grande y consecutiva de carga negativa, la cual abarcaría el Glu13, Asp14, pSer15, Glu16 y Glu17 (NH<sub>2</sub>-EDpSEE-COO).



A pesar de los esfuerzos por comprender el proceso de mineralización y por consiguiente la formación de tejidos mineralizados, aún se desconoce mucho sobre las interacciones entre las PNC y los cristales de HA. Las interacciones proteína-mineral en la interfase de la fase orgánica-inorgánica son factores importantes para asegurar que la mineralización transcurra de una manera cuidadosamente organizada, de modo que los cristales de apatita se depositen y crezcan adecuadamente (60). Ampliar el conocimiento sobre las estructuras de los componentes de los tejidos mineralizados sanos es clave para comprender los cambios patológicos que pueden ocurrir durante el estado de enfermedad.

El estudio del proceso de formación de tejidos mineralizados, en el contexto de la biomineralización, es de gran relevancia ya que la información derivada podría contribuir con un impacto biomédico en la innovación de terapias y estrategias para reparar o regenerar tejidos mineralizados humanos. Esta es un área importante debido al continuo aumento de la esperanza de vida media de los seres humanos, que predispone a condiciones patológicas como la osteoporosis y los riesgos de fracturas que ello conlleva. A partir de estos estudios podrían crearse materiales biomiméticos inspirados en péptidos para la funcionalización de andamios con aplicación dentro del área de conocimiento de la Ingeniería tisular, particularmente para la regeneración de huesos y tejidos dentales (79). En comparación con las proteínas completas SIBLING, comúnmente de gran peso molecular y/o con cadenas largas, los péptidos derivados de estas proteínas que contengan regiones funcionales pueden ser mucho menos costosos, más estables y específicos, lo que los convierte en candidatos rentables para aplicaciones clínicas.

## CONCLUSIONES

- El péptido 1 de la BSP mantiene un radio de giro de  $\sim 0.7$  nm durante toda la simulación, lo que indica que la región comprendida entre el aminoácido 4-23 de la secuencia primaria total se mantiene estable en solución en una conformación altamente plegada.
- En presencia de HA el péptido 1 de la BSP presenta una compactación menor con respecto al péptido que se encuentra únicamente en solución, lo que sugiere que establece interacciones con el cristal de HA.
- Los valores de RMSF indican que el péptido 1 en solución tiene una alta flexibilidad excepto por los aminoácidos Arg6, Val7, Glu13 y 14, Asn15 y Gly16, los cuales presentan los valores más bajos de RMSF y corresponden a regiones rígidas. En presencia de HA su estructura adquiere una mayor rigidez.
- El péptido 1 interactúa con el cristal de HA a través de las cadenas laterales de los aminoácidos Glu13 y Glu14, que corresponden a Glu16 y Glu17 en la secuencia primaria de la BSP, respectivamente. Por lo tanto, la interacción entre el péptido 1 y HA se produce por interacciones electrostáticas que se establecen entre las cargas negativas de los grupos carboxilos laterales de Glu16 y Glu17 y las cargas positivas del calcio que se encuentra en la superficie del cristal de HA.

## PERSPECTIVAS

1. Analizar el resto de las regiones de BSP que se han propuesto con una alta posibilidad de interactuar con la HA.
2. Estudiar el efecto de las modificaciones postraduccionales de la BSP en su interacción con cristales de HA mediante SDM, específicamente aquellas que se encuentran en el extremo amino terminal. Esto daría una idea más fidedigna del mecanismo de interacción con el cristal mineral que ocurre en condiciones fisiológicas. Asimismo, este análisis proporcionaría un rango más amplio de péptidos funcionales para seleccionar con mayor precisión el que cuente con las características que se deseen y continuar con estudios experimentales.
3. Comprobar los resultados obtenidos en el presente trabajo mediante pruebas físicas tales como la técnica de difracción de rayos X de bajo ángulo (SAXS) o dispersión dinámica de luz (DLS). Con ellas que se podría analizar el grado de compactación del péptido, comprobando así los resultados de radio de giro del péptido en solución y analizar el efecto de la interacción con HA. En cuanto a las características estructurales y de unión al cristal, estos análisis deben obtenerse mediante inferencias indirectas a partir de mediciones espectrales de técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN), dicroísmo circular (DC) o isotermas de adsorción.
4. Además de continuar con el estudio de la interacción BSP-HA, se propone analizar la interacción BSP-colágeno y BSP-integrina para complementar los estudios ya realizados sobre la interacción BSP-iones  $Ca^{+}$ , y tener así el esquema completo de las formas de interacción con sus ligandos fisiológicos. Esto permitirá realizar un análisis detallado de los mecanismos de acción de BSP y su papel en la MEC del tejido óseo en formación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, et al. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11:4743-63.
2. Lin X, Patil S, Gao Y-G, Qian A. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Front Pharmacol* 2020; 11:757.
3. Gorski JP. Biomineralization of bone: a fresh view of the roles of non-collagenous proteins. *Front Biosci Landmark Ed*. 2011; 16:2598-621.
4. Kalmar L, Homola D, Varga G, Tompa P. Structural disorder in proteins brings order to crystal growth in biomineralization. *Bone* 2012; 51(3):528-34.
5. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible Structures of SIBLING Proteins, Bone Sialoprotein, and Osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 280(2):460-5.
6. Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015; 16(1):18-29.
7. Uversky VN. Functional roles of transiently and intrinsically disordered regions within proteins. *FEBS J*. 2015; 282(7):1182-9.
8. Forman-Kay JD, Mittag T. From Sequence and Forces to Structure, Function and Evolution of Intrinsically Disordered Proteins. *Structure* 2013; 21(9):1492-9.
9. Xie H, Vucetic S, Iakoucheva LM, Oldfield CJ, Dunker AK, Uversky VN, et al. Functional Anthology of Intrinsic Disorder. I. Biological Processes and Functions of Proteins with Long Disordered Regions. *J Proteome Res*. 2007; 6(5):1882-98.
10. Deiana A, Forcelloni S, Porrello A, Giansanti A. Intrinsically disordered proteins and structured proteins with intrinsically disordered regions have different functional roles in the cell. *PLoS ONE* 2019; 14(8):e0217889.
11. Cross KJ, Huq NL, Reynolds EC. Protein dynamics of bovine dentin phosphophoryn. *J Pept Res*. 2005; 66(2):59-67.
12. Dentina Sialophoprotein (DSPP) y Dentina [Internet]. [citado 5 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797732/#R47>
13. Bouleftour W, Juignet L, Bouet G, Granito RN, Vanden-Bossche A, Laroche N, et al. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology - Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2016; 52-54:60-77.

14. Gianni S, Dogan J, Jemth P. Coupled binding and folding of intrinsically disordered proteins: what can we learn from kinetics? *Curr Opin Struct Biol.* 2016; 36:18-24.
15. George A, Veis A. Phosphorylated Proteins and Control Over Apatite Nucleation, Crystal Growth and Inhibition. *Chem Rev.* 2008; 108(11):4670-93.
16. Heinegård D, Oldberg Å. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* 1989; 3(9):2042-51.
17. Ganss B, Kim RH, Sodek J. Sialoproteína Ósea. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10(1):79-98.
18. Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(18):8562-5.
19. Yang Y, Cui Q, Sahai N. How Does Bone Sialoprotein Promote the Nucleation of Hydroxyapatite? A Molecular Dynamics Study Using Model Peptides of Different Conformations. *Langmuir* 2010; 26(12):9848-59.
20. Margolis HC, Kwak S-Y, Yamazaki H. Role of mineralization inhibitors in the regulation of hard tissue biomineralization: relevance to initial enamel formation and maturation. *Front Physiol.* 2014; 5:339.
21. Butler WT. Mineralized tissues: An overview. En: *Methods in Enzymology [Internet]. Academic Press; 1987 [citado 1 de julio de 2021]. p. 255-61. (Structural and Contractile Proteins Part E: Extracellular Matrix; vol. 145). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687987450143>*
22. Medina S, Salazar L, Mejía C, Moreno F. In vitro behavior of the dentin and enamel calcium hydroxyapatite in human premolars subjected to high temperatures. *DYNA* 2016; 83(195):34-41.
23. Nanci A, editor. Chapter 9 - Periodontium. En: *Ten Cate's Oral Histology (Eighth Edition) [Internet]. St. Louis (MO): Mosby; 2013 [citado 3 de julio de 2021]. p. 205-32. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323078467000094>*
24. Zimmerman B, Jenzer AC. Physiology, Tooth [Internet]. *StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021 [citado 3 de julio de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538475/>*
25. Tortora GJ, A02, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología / Principles of Anatomy and Physiology: Incluye Sitio Web. Editorial Medica Panamericana Sa de; 2013. 1300 p.
26. Rho J-Y, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys.* 1998; 20(2):92-102.

27. Meskinfam M. 17 - Polymer scaffolds for bone regeneration. En: Tanzi MC, Farè S, editores. *Characterization of Polymeric Biomaterials* [Internet]. Woodhead Publishing; 2017 [citado 4 de julio de 2021]. p. 441-75. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081007372000170>
28. Nanci A, editor. Chapter 1 - Structure of the Oral Tissues. En: *Ten Cate's Oral Histology (Eighth Edition)* [Internet]. St. Louis (MO): Mosby; 2013 [citado 3 de julio de 2021]. p. 1-13. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978032307846700001X>
29. Boskey AL, Villarreal-Ramirez E. Intrinsically disordered proteins and biomineralization. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2016; 52-54:43-59.
30. González-Paz RJ, Feijoo JL, Noris-Suárez K, Ferreira AM, González G. Caracterización mediante FTIR y DSC de la interacción colágeno — hidroxiapatita. En: Müller-Karger C, Wong S, La Cruz A, editores. *IV Latin American Congress on Biomedical Engineering 2007, Bioengineering Solutions for Latin America Health*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2008. p. 1246-9. (IFMBE Proceedings).
31. Robinson RA, Watson ML. Collagen-crystal relationships in bone as seen in the electron microscope. *Anat Rec*. 1952; 114(3):383-409.
32. Beniash E. Biominerals--hierarchical nanocomposites: the example of bone. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2011; 3(1):47-69.
33. Veis A, Dorvee JR. Biomineralization Mechanisms: A new paradigm for crystal nucleation in organic matrices. *Calcif Tissue Int*. 2013; 93(4):307-15.
34. Golub EE. Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. *Semin Immunopathol*. 2011; 33(5):409-17.
35. González JMM. Donado. *Cirugía Bucal: Patología Y Técnica*. Elsevier Health Sciences; 2019. 548 p.
36. Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis. *Lancet Lond Engl*. 2019; 393(10169):364-76.
37. Yen C-C, Lin W-C, Wang T-H, Chen G-F, Chou D-Y, Lin D-M, et al. Pre-screening for osteoporosis with calcaneus quantitative ultrasound and dual-energy X-ray absorptiometry bone density. *Sci Rep*. 2021; 11:15709.
38. Cavarretta E. Pathological Biomineralization in the Calcific Aortic Valve. *J Cardiovasc Med Cardiol*. 2016; 045-6.
39. Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res*. 2003; 44 Suppl 1:33-40.

40. Theillet F-X, Binolfi A, Frembgen-Kesner T, Hingorani K, Sarkar M, Kyne C, et al. Physicochemical Properties of Cells and Their Effects on Intrinsically Disordered Proteins (IDPs). *Chem Rev.* 2014; 114(13):6661-714.
41. Weiner S, Addadi L. Acidic macromolecules of mineralized tissues: the controllers of crystal formation. *Trends Biochem Sci.* 1991; 16(7):252-6.
42. Aizenberg J, Black AJ, Whitesides GM. Control of crystal nucleation by patterned self-assembled monolayers. *Nature* 1999; 398(6727):495-8.
43. He G, Dahl T, Veis A, George A. Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat Mater.* 2003; 2(8):552-8.
44. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int.* 1991; 49(6):421-6.
45. Franzén A, Heinegård D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J.* 1985; 232(3):715-24.
46. Wuttke M, Müller S, Nitsche DP, Paulsson M, Hanisch F-G, Maurer P. Structural Characterization of Human Recombinant and Bone-derived Bone Sialoprotein: functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding. *J Biol Chem.* 2001; 276(39):36839-48.
47. Uversky VN, Dunker AK. Understanding Protein Non-Folding. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1804(6):1231-64.
48. Frueh DP, Goodrich A, Mishra S, Nichols S. NMR methods for structural studies of large monomeric and multimeric proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2013; 23(5):734-9.
49. Na J-H, Lee W-K, Yu YG. How Do We Study the Dynamic Structure of Unstructured Proteins: A Case Study on Nopp140 as an Example of a Large, Intrinsically Disordered Protein. *Int J Mol Sci [Internet].* 27 de enero de 2018 [citado 19 de marzo de 2021];19(2). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5855603/>
50. Dosztányi Z, Mészáros B, Simon I. Bioinformatical approaches to characterize intrinsically disordered/unstructured proteins. *Brief Bioinform.* 2010; 11(2):225-43.
51. Perovic V, Sumonja N, Marsh LA, Radovanovic S, Vukicevic M, Roberts SGE, et al. IDPpi: Protein-Protein Interaction Analyses of Human Intrinsically Disordered Proteins. *Sci Rep.* 2018; 8(1):10563.
52. Vincent K, Durrant MC. A structural and functional model for human bone sialoprotein. *J Mol Graph Model.* 2013; 39:108-17.

53. Hunter GK, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J.* 1994; 302(Pt 1):175-9.
54. Lozano-Aponte J, Scior T. ¿Qué sabe Ud. Acerca de... Dinámica Molecular? *Rev Mex Cienc Farm.* 2014; 45(1):86-8.
55. Durrant JD, McCammon JA. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol.* 2011; 9(1):71.
56. Karplus M, McCammon JA. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat Struct Biol.* 2002; 9(9):646-52.
57. Hospital A, Goñi JR, Orozco M, Gelpí JL. Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Adv Appl Bioinforma Chem AABC.* 2015; 8:37-47.
58. Hollingsworth SA, Dror RO. Molecular dynamics simulation for all. *Neuron* 2018; 99(6):1129-43.
59. González MA. Force fields and molecular dynamics simulations. *Éc Thématique Société Fr Neutron* 2011; 12:169-200.
60. Karplus M, Petsko GA. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* 1990; 347(6294):631-9.
61. Spoel DVD, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible, and free. *J Comput Chem.* 2005; 26(16):1701-18.
62. PyMOL | pymol.org [Internet]. [citado 14 de abril de 2021]. Disponible en: <https://pymol.org/2/>
63. Mostafa NY, Brown PW. Computer simulation of stoichiometric hydroxyapatite: Structure and substitutions. *J Phys Chem Solids.* 2007; 68(3):431-7.
64. Gale JD. GULP: A computer program for the symmetry-adapted simulation of solids. *J Chem Soc Faraday Trans.* 1997; 93(4):629-37.
65. Bhowmik R, Katti KS, Katti D. Molecular dynamics simulation of hydroxyapatite–polyacrylic acid interfaces. *Polymer* 2007; 48(2):664-74.
66. Lobanov M, Bogatyreva N, Galzitskaya O. Radius of gyration is indicator of compactness of protein structure. *Mol Biol (Mosk).* 2008; 42:701-6.
67. Gordon JAR, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* 2007; 41(3):462-73.



68. Rabe M, Verdes D, Seeger S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011; 162(1):87-106.
69. Villarreal-Ramirez E, Garduño-Juarez R, Gericke A, Boskey A. The role of phosphorylation in dentin phosphoprotein peptide adsorption to hydroxyapatite surfaces: a molecular dynamics study. *Connect Tissue Res.* 2014; 55(0 1):134-7.
70. Villarreal-Ramirez E, Eliezer D, Garduño-Juarez R, Gericke A, Perez-Aguilar JM, Boskey A. Phosphorylation regulates the secondary structure and function of dentin phosphoprotein peptides. *Bone* 2017; 95:65-75.
71. Balasubramanian D, Misra BC. Effects of metal ions on the structure and spectra of the peptide group. *Biopolymers* 1975; 14(5):1019-26.
72. Crevenna AH, Naredi-Rainer N, Lamb DC, Wedlich-Söldner R, Dzubiella J. Effects of Hofmeister Ions on the  $\alpha$ -Helical Structure of Proteins. *Biophys J.* 2012; 102(4):907-15.
73. Uversky VN. Intrinsically disordered proteins and their environment: effects of strong denaturants, temperature, pH, counter ions, membranes, binding partners, osmolytes, and macromolecular crowding. *Protein J.* 2009; 28(7-8):305-25.
74. Tavafoghi M, Cerruti M. The role of amino acids in hydroxyapatite mineralization. *J R Soc Interface* 2016; 13(123):20160462.
75. Matsumoto T, Okazaki M, Inoue M, Hamada Y, Taira M, Takahashi J. Crystallinity and solubility characteristics of hydroxyapatite adsorbed amino acid. *Biomaterials* 2002; 23(10):2241-7.
76. Azzopardi PV, O'Young J, Lajoie G, Karttunen M, Goldberg HA, Hunter GK. Roles of Electrostatics and Conformation in Protein-Crystal Interactions. *PLOS ONE* de 2010; 5(2):e9330.
77. Kalka M, Zoglowek A, Ozyhar A, Dobryczycki P. Proteins in Calcium Phosphates Biomineralization [Internet]. *Contemporary Topics about Phosphorus in Biology and Materials.* IntechOpen; 2019 [citado 23 de julio de 2021]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/67542>
78. Zaia J, Boynton R, Heinegård D, Barry F. Posttranslational Modifications to Human Bone Sialoprotein Determined by Mass Spectrometry. *Biochemistry* 2001; 40(43):12983-91.
79. Palmer LC, Newcomb CJ, Kaltz SR, Spoerke ED, Stupp SI. Biomimetic Systems for Hydroxyapatite Mineralization Inspired By Bone and Enamel. *Chem Rev.* 2008; 108(11):4754-83.