

ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL PROTEICO DEL ESMALTE DENTAL ERUPCIONADO¹

STANDARDIZATION OF A PROTOCOL OF EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF ERUPTED DENTAL ENAMEL PROTEINS

² Gina Castiblanco.

³ Leopold Ilag.

⁴ Jaime Castellanos.

⁵ Stefania Martignon.

⁶ Wilson Mejía.

Resumen

Introducción: El 95% del peso del esmalte dental erupcionado sano corresponde a material inorgánico, 4% agua y 1% a materia orgánica (con un 0,03 a 0,1% de trazas de proteínas estructurales). En el caso del esmalte con defectos del desarrollo - como la fluorosis dental - existe evidencia de la retención de material proteico, despertando la necesidad del estudio del proteoma del esmalte en estas condiciones. Limitaciones inherentes a los tejidos duros, como su bajo contenido proteico encerrado en una matriz mineral, dificultan los procesos de extracción y caracterización de proteínas. El presente estudio, busca hacer una adaptación metodológica de los procedimientos de extracción de proteínas en esmalte dental erupcionado humano, para su posible aplicación al estudio del proteoma del esmalte con defectos del desarrollo.

Abstract

Introduction: 95% of erupted enamel corresponds to inorganic material, 1% organic and 4% water content (by weight) and it only has traces of structural proteins (0,03–0,1%), making extraction and characterization a difficult process. Enamel developmental defects as dental fluorosis, have been related to protein retention, indicating a clear need for the study of the enamel proteome. Standardization of methods for extraction and characterization of enamel proteins will allow the characterization of the human enamel proteome under these particular conditions.

Methods: ethical approval from Universidad El Bosque ethics committee was granted and informed consent was given. Human permanent erupted teeth were collected from Universidad El Bosque Dental Clinics. The teeth

Recibido el 26/09/2012

Aprobado 08/11/2012

1. Artículo original
2. Candidata a Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad El Bosque. Unidad de Investigación en Caries UNICA. Facultad de Odontología, Universidad El Bosque, Carrera 7 B Bis No. 132 – 11 Edificio Fundadores, Segundo Piso. Bogotá, Colombia. gcastiblanco@unbosque.edu.co
3. PhD. Departamento de Química Analítica. Universidad de Estocolmo, Svante Arrhenius Väg 16 SE10691. Estocolmo, Suecia. leopold.ilag@anchem.su.se
4. PhD. Grupo de Virología. División de Investigaciones, Universidad El Bosque, Carrera 7 B Bis No. 132 – 11 Edificio Rectoría, Segundo Piso. Bogotá, Colombia. castellanosjaime@unbosque.edu.co
5. PhD. Unidad de Investigación en Caries UNICA. Facultad de Odontología, Universidad El Bosque. Carrera 7 B Bis No. 132 – 11 Edificio Fundadores, Segundo Piso. Bogotá, Colombia. martignonstefania@unbosque.edu.co
6. PhD. Unidad de Investigación en Caries UNICA. Facultad de Odontología, Universidad El Bosque, Carrera 7 B Bis No. 132 – 11 Edificio Fundadores, Segundo Piso. Bogotá, Colombia. mejjwilson@unbosque.edu.co

Objetivo: Estandarizar una técnica de extracción y caracterización del material proteico del esmalte de dientes erupcionados.

Materiales y métodos: Se recolectaron dientes sanos con extracción indicada y se realizaron: -cortes de secciones longitudinales de 550 µm, - separación mecánica de esmalte/dentina y - pulverización de esmalte dental. El pulverizado se sometió a desmineralización/precipitación de proteínas con TCA 12%. El extracto fue separado por electroforesis SDS-PAGE y caracterizado por LC-MS/MS.

Resultados: el procedimiento fue estandarizado. No se evidenciaron bandas de proteína después de la electroforesis SDS-PAGE, pero se identificaron y caracterizaron 138 péptidos, correspondientes a 13 proteínas, 3 de ellas específicas del esmalte (Amelogenina X, Amelogenina Y, Ameloblastina).

Conclusiones: por primera vez en Colombia, se estandarizan y se adaptan métodos de extracción y caracterización de proteínas del esmalte dental, abriendo las puertas al estudio del proteoma de este tejido.

Palabras clave: esmalte dental, proteínas del esmalte dental, proteoma, espectrometría de masas.

crowns were cut in 550 µm sections, and dental tissues were separated. The enamel sections were grinded with liquid nitrogen to get enamel powder. Powdered enamel was demineralized and the proteins precipitated with TCA 12%. The proteins were separated by SDS-PAGE Electrophoresis and characterized by LC-MS/MS.

Results: enamel powdering and protein extraction techniques were standardized at Universidad El Bosque laboratories. No protein bands were detected after SDS-PAGE Electrophoresis, however, by LC-MS/MS, 138 peptides from 13 proteins were identified, 3 of them enamel-specific (Amelogenin X, Amelogenin Y).

Conclusions: for the first time in Colombia, methods for extraction and characterization of proteins are standardized and applied on dental enamel, opening the doors for the study of the proteome from sound and defective dental enamel.

Keywords: dental enamel, dental enamel proteins, proteome, mass spectrometry.

INTRODUCCIÓN

El esmalte dental es un tejido de origen ectodérmico, altamente mineralizado que cubre la corona anatómica de los dientes. Es acelular, avascular y no posee inervación. Por peso, está compuesto en un 95% por material inorgánico, 4% agua y 1% materia orgánica(1).

El mineral del esmalte corresponde a hidroxiapatita de carbonato de calcio, siendo el modelo estructural mas cercano el de la hidroxiapatita de calcio (OHAp), cuya unidad estructural o "celda unitaria" tiene la fórmula $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. El esmalte difiere con la hidroxiapatita ideal, en que incorpora otros iones en su estructura, como HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , Na^+ y F^- (1).

Los cristales de apatita carbonatada se extienden desde la dentina hasta la superficie del esmalte, organizándose en grupos de aproximadamente 1000 cristales, denominados "prismas del esmalte". En la periferia de cada prisma, se encuentra el espacio inter-cristalino, donde se localizan agua (2) y trazas de proteínas estructurales (0.03-0.1% de su peso total) (3). A través del espacio intercristalino se genera intercambio iónico con el medio circundante(2).

El mecanismo de desarrollo del esmalte –amelogénesis- puede dividirse en tres fases: - secretoria, en la que la mayoría de proteínas son secretadas, - transicional, cuando los ameloblastos pierden la mayoría de sus órganos secretores, se acortan y pierden estructuras denominadas procesos de Tomes y - maduración, cuando el esmalte pierde agua y materia orgánica, cuyo espacio es llenado posteriormente por los cristales de esmalte que continúan su crecimiento(4).

Durante el desarrollo del esmalte dental, aproximadamente el 30% corresponde a material proteico, pero alrededor del 90% de este se pierde durante la maduración (5). La amelogenina es la proteína más abundante en el esmalte inmaduro, y representa aproximadamente el 90% de todas las proteínas secretadas por el ameloblasto. Esta proteína contiene dominios altamente hidrofóbicos (ricos en prolina, glutamina, leucina e histidina), con la excepción de las secuencias hidrofílicas N y C terminal. Lo anterior permite que los monómeros de amelogenina se organicen en estructuras supramoleculares de 20 nm de diámetro denominadas nanoesferas (6). La amelogenina y otras proteínas no amelogeninas de matriz extracel-

lular (proteínas de esmalte aniónicas, ameloblastina, enamulina, tuftelina, proteínas sulfatadas y proteasas del esmalte) modulan la nucleación, deposición y crecimiento del cristal del esmalte durante la morfogénesis del diente(7).

En el proceso de maduración del esmalte las proteínas amelogenina y no amelogeninas son hidrolizadas por dos proteasas conocidas como metaloproteinasa (MMP-20 o enamelinasa) y kalikreina-4 (KLK-4) permitiendo la formación de una matriz de esmalte madura totalmente mineralizada (8). El esmalte maduro contiene trazas de proteínas estructurales (0,03 – 0,1%) y solo se encuentran algunos fragmentos proteolíticos presentes en bajas cantidades, como las isotomas TRAP (tyrosine-rich amelogenin peptide) y LRAP (leucine-rich amelogenin peptide) (4).

El estudio del material proteico del esmalte dental, presenta limitaciones inherentes a los tejidos duros, como el bajo contenido de material orgánico y el difícil acceso a proteínas encerradas en una matriz calcificada (9). En 2006, se reportaron protocolos para la adecuada extracción y purificación de material proteico del esmalte dental murino en diferentes etapas de desarrollo (10). Por otro lado, para la identificación del material proteico de los extractos obtenidos, se ha hecho uso de Espectrometría de Masas -MALDI-TOF/TOF en dientes permanentes de especímenes arqueológicos, con resultados satisfactorios (11) y en terceros molares humanos (12). Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente estudio nos proponemos estandarizar un protocolo de extracción de proteínas del esmalte dental erupcionado humano sano, a partir de muestras obtenidas de las clínicas odontológicas de la Universidad El Bosque.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestra

Con la aprobación del comité de ética en investigación de la Universidad El Bosque código UB.267.2010, se recolectaron dientes con extracción indicada por motivos ortodóncicos o periodontales, previo consentimiento informado. Los dientes sanos fueron seleccionados para el presente estudio, y se excluyeron aquellos que cumplieran con criterios ICDAS (International Caries Assesment and Detection System) 1 al 6, índice TFI (Thylstrup & Fejerskov) de fluorosis 1-9 o cualquier otro defecto de desarrollo del esmalte dental. Los dientes fueron limpiados, lavados y almacenados en timol al 0.01% en PBS a -4°C hasta su uso.

Corte de dientes en secciones longitudinales de 550 µm

Los tercios medio y apical de la raíz de cada diente, fueron cortados con una fresa de alta velocidad, para su posterior montaje en cubos de resina acrílica de autocurado (Figura 1 A,B). El diente y su base se posicionaron en el micrótopo Isomet 5000 (Buehler) (Figura 1, C), y se probaron diferentes condiciones de: - velocidad de disco, - alimentación y - espesor de muestra, hasta establecer los parámetros ideales para cumplir el objetivo de este estudio.

Separación de tejidos dentales y obtención de esmalte pulverizado

Después de obtener las secciones de 550 µm (Figura 1, D), se realizó separación mecánica del esmalte y la dentina con ayuda de un bisturí y/o pinza algodonerá (Figura 1, E), bajo estereomicroscopio. Las secciones de esmalte se sometieron a pulverización en mortero con nitrógeno líquido (Figura 1, F), obteniendo un pulverizado de esmalte que se almacenó a -70°C hasta su uso (Figura 1, G).

Extracción de material proteico del esmalte dental

Se utilizó el protocolo del ácido tri-cloro acético (TCA) reportado por Porto & Line en 2011, con algunas modificaciones: siguiendo una proporción de 200 µl de TCA por cada mg de pulverizado de esmalte, se adicionó solución de TCA al 12 % con inhibidores de proteasas (PMSF 2mM, Leupeptina 10µM y Aprotinina 5 µg/ml). La solución se incubó, en agitación constante y a temperatura ambiente, durante una hora. Se adicionó deoxicolato de sodio en una concentración final de 200µg/ml, y se incubó overnight a 0°C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13000 g 4°C por 10 min. El sobrenadante fue descartado y se hicieron dos lavados con acetona a -20°C, centrifugando a 13000 g a 4°C durante 10 min. Finalmente, el pellet se resuspendió en Úrea 6M con inhibidores de proteasas. El extracto proteico fue desalinizado y concentrado utilizando puntas con resina de cromatografía de fase reversa ZipTip® (Millipore) siguiendo el protocolo del fabricante, eluyendo con ácido fórmico y acetonitrilo (ACN). Los extractos fueron almacenados a -70 °C para su posterior separación por electroforesis. Algunos fueron liofilizados para su posterior identificación y secuenciación por espectrometría de masas.

Cuantificación del material proteico

Para la cuantificación del material proteico obtenido se empleó el espectrofotómetro nanodrop® (ThermoScientific) a 280 nm con albúmina como estándar de cuantificación en el software, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Separación del material proteico por electroforesis SDS-PAGE

Se empleó el protocolo para electroforesis en sistema de buffer discontinuo Laemmli con gel de dodecilsulfato de sodio/poliacrilamida (SDS-PAGE) (13). Previa cuantificación, 15 µl de extracto proteico del esmalte dental fueron sembrados en uno de los carriles del gel de poliacrilamida al 15%, así como marcadores de peso molecular (Protein Ladder, Fermentas USA) y lisado de cerebro de ratón como control de la tinción. Para la visualización de las bandas de proteína, se empleó el Kit Silver Stain© (Pierce, Thermo Scientific).

Identificación y secuenciación de los péptidos con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC/MS-MS)

Un extracto liofilizado fue analizado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Estocolmo (Proteomics Facility-Stockholm University). Los péptidos eluidos fueron secados y re-suspendidos en ACN 3 % y ácido fórmico al 0,2 %. Los análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem se hicieron con el sistema Easy-nLC (Thermo Scientific), directamente acoplado a un espectrómetro de masas QExactive (Thermo Scientific, Bremen, Germany).

La separación de péptidos se hizo en columna de 10 cm con punta de sílica (SilicaTips™ New Objective Inc.) Para la separación cromatográfica se utilizó ACN con sistema de solventes acuosos con ácido fórmico 0,2%. El gradiente utilizado fue: 3–48% de ACN/50 min, 48–80% ACN / 3 min y 80% ACN /7 min, a un flujo de 300nl/min.

El método de espectrometría consistió en un escaneo de rango m/z de 300 a 1650 con una resolución de R=70,000 a una m/z de 400, seguido de 10 escaneos MS/MS dependientes de los datos de los primeros 10 iones precursores con un estado de carga ≥ 2 . Los datos se buscaron en la base de datos SwissProt, con el software Mascot 2,3 (Matrix Science Ltd., London, UK). Se tuvieron en cuenta los péptidos con un puntaje de alineamiento (protein score) mayor a 23.

RESULTADOS

Corte de secciones longitudinales de la corona de dientes sanos para la obtención de esmalte pulverizado

Durante el proceso de estandarización del corte de secciones longitudinales, se empleó el micrótopo Isomet 5000 (Buehler). Los parámetros con los que se obtuvieron cortes satisfactorios para el cumplimiento de los objetivos del presente estudio (separación mecánica de esmalte y dentina) fueron: velocidad de disco 200 rpm, velocidad de alimentación de 2,2 mm/min, distancia remanente 0, espesor de muestra 0,550 mm, espesor de cuchilla 0,381 mm. Los cortes de espesor de 550 µm minimizan la pérdida de tejido debido al espesor de la cuchilla, con una adecuada separación de tejidos dentarios para la pulverización de los fragmentos.

Para el proceso de estandarización, se cortaron un total de 40 dientes sanos. Después del proceso de corte, se obtuvo el peso total de esmalte obtenido por cada diente en gramos. La tabla 1 muestra la media de peso obtenido por grupo dental, encontrando que en el grupo de molares superiores se obtiene la mayor cantidad de esmalte (0,35 g) en comparación a grupos como premolares (0,19 g) e incisivos inferiores (0,04 g).

Separación del material proteico por electroforesis SDS-PAGE

Se realizaron electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15% siguiendo el protocolo estándar reportado por Laemmli en 1970 (13), para separar el material proteico obtenido por extracción con TCA al 12%. No se evidenciaron bandas de proteínas después de la tinción con nitrato de plata.

Identificación y secuenciación de los péptidos con LC/MS-MS

El análisis por espectrometría de masas de uno de los extractos, permitió la identificación de 295 péptidos correspondientes a 13 proteínas diferentes. La **tabla 2** muestra la identidad de la proteína a la que pertenece cada péptido, relación masa/carga (m/z), peso molecular y secuencia de aminoácidos de un péptido representativo de cada proteína.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se estandarizó el procedimiento de corte de secciones longitudinales de la corona de

dientes sanos haciendo uso del equipo automático de alta velocidad Isomet 5000 (Buehler), utilizado por primera vez en nuestro grupo y en Colombia para investigación en odontología. El protocolo estandarizado por nuestro grupo será útil no solo para la obtención de secciones destinadas a pulverización; también para otras aplicaciones como corte de secciones longitudinales delgadas para uso en estereomicroscopía y microscopía de luz polarizada, aplicado al estudio de la estructura de los tejidos duros dentales.

La presencia de material proteico en los extractos obtenidos por precipitación con TCA al 12%, se confirmó por cuantificación a 280 nm. Sin embargo, no fue posible obtener bandas de proteínas por electroforesis SDS-PAGE. Esto puede explicarse por el bajo peso molecular de los péptidos del esmalte dental erupcionado, producto del clivaje de amelogenina (11). Es posible que estos péptidos de bajo peso molecular, abandonen el gel antes que el frente de corrido al finalizar la electroforesis. Estos resultados coinciden con los reportados por Porto et al en 2011(12), donde no se apreciaron bandas de electroforesis de los extractos obtenidos con TCA al 12% del esmalte dental erupcionado. Estos resultados demostraron la necesidad de detección de estos péptidos con el uso de técnicas más sensibles. Como consecuencia, uno de los extractos obtenidos en este estudio, fue sometido a cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

Se identificaron por medio de LC-MS/MS, 138 péptidos correspondientes a 13 proteínas. Esta técnica ha sido aplicada anteriormente sobre extractos proteicos del esmalte dental (12, 13, 14), sin embargo, por primera vez se analizan los péptidos tal como se encuentran *in vivo*, sin digestión previa con proteasas como tripsina (procedimiento de rutina en experimentos de proteómica). Esta modificación a la técnica demostró ser apropiada para la caracterización de los péptidos que ocurren de forma natural en el esmalte dental de dientes permanentes erupcionados, y puede ser útil en el estudio de la ocurrencia de los péptidos remanentes en el esmalte dental maduro con defectos del esmalte.

Las amelogeninas son un grupo heterogéneo de proteínas, con secuencias específicas que derivan de los cromosomas X, Y (11). Se identificaron péptidos de amelogeninas de las dos isoformas (28 y 27 péptidos, respectivamente). El extracto proteico empleado en el presente estudio, corresponde a una mezcla del pulverizado de esmalte de diferentes piezas dentales, por lo que se esperaba la presencia de estas dos isoformas en forma abundante. La ameloblastina, también específica del esmalte dental, fue identificada con 21 péptidos.

Adicionalmente, fue identificado colágeno tipo I y III. A pesar de que la contaminación con proteínas de la dentina es posible con una separación manual de tejidos como la empleada en el presente estudio, se ha reportado la presencia de colágeno tipo I en esmalte dental, siendo todavía un tema de controversia (15).

La identificación de proteínas no específicas del esmalte dental (tabla 2), puede atribuirse a la contaminación de la muestra o la mezcla de muestras provenientes de diferentes individuos. Sin embargo, se requieren estudios posteriores donde se utilicen piezas dentales individuales que garanticen una mínima contaminación del extracto y proporcionen información específica de la muestra.

La presente investigación representó, por primera vez en nuestro país, la estandarización y adaptación en los laboratorios de la Universidad El Bosque, de los métodos de extracción de proteínas del esmalte dental previamente reportados. Se demostró la capacidad de la técnica para la identificación de proteínas de esmalte dental erupcionado. De esta manera, se abren las puertas para el estudio del proteoma del esmalte dental con defectos del desarrollo de alta prevalencia en Colombia.

Agradecimientos: al programa Jóvenes Investigadores e Innovadores “Virginia Gutiérrez de Pineda”, de la convocatoria 510 de 2010, por la financiación de la joven investigadora que ejecutó el proyecto y a la División de Investigaciones de la Universidad El Bosque por la financiación del proyecto. Al Instituto Karolinska (Estocolmo, Suecia), por la realización de los experimentos de LC-MS/MS. A Jaime Castellanos y el Grupo de Virología de la Universidad El Bosque por su invaluable asesoría y colaboración.

Financiación: esta investigación fue financiada por la División de Investigaciones de la Universidad El Bosque, el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Estocolmo (Suecia) y el programa Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias.

El presente trabajo hace parte de los resultados obtenidos durante la beca pasantía Virginia Gutiérrez de Pineda “Jóvenes Investigadores e Innovadores” otorgada a Gina Alejandra Castiblanco en el año 2010.

Los resultados fueron presentados en el XVIII Congreso Institucional de Investigaciones de la Universidad El Bosque (Bogotá, 19 de Septiembre de 2012) y el XXII Encuentro Nacional de Investigación Odontológica ACFO (Bogotá, 29 de Septiembre de 2012).

CONFLICTO DE INTERÉS: los autores no registran conflictos de interés en este artículo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Simmer JP, Fincham a G. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995;6:84–108.
2. Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000 ;11:481–95.
3. Fincham a G, Moradian-Oldak J, Simmer JP. *J Struct Biol.* 1999; 126:270–99.
4. Moradian-Oldak J. Protein-Mediated Enamel Mineralization. *Front Biosci.* 2002; 17:1996-2023.
5. Glimcher M, Brickley-Parsons D, Levine P. Studies of ename proteins during maturation. *Calcif Tissue Res.* 1977; 24:259 – 70
6. Du C, Falini G, Fermani S, Abbott C, Moradian-Oldak J. Supramolecular assembly of amelogenin nanospheres into birefringent microribbons. *Science.* 2005; 57:1450-4.
7. Zeichner-David M. Is there more to enamel matrix proteins than biomineralization? *Matrix Biol.* 2001; 20:307 - 16.
8. Jean-Yves S, Sidney D, Delphine F, Marc G. Amelogenin: lessons from evolution. *Arch Oral Biol.* 2005;2:205-12.
9. Hubbard M, Kon J. Proteomic Analysis of dental tissues. *J Chromatogr.* 2002; 771: 211-220.
10. Porto M, Line R. Comparison of three methods for enamel protein extraction in different developmental rat phases of rat lower incisors. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114:272-275.
11. Nielsen M, Stegemann C. Extraction and sequencing of human and Neanderthal mature enamel proteins using MALDI-TOF/TOF MS. *J Archaeol Sci.* 2009; 36: 1758–1763
12. Porto, I., Laure HJ, Barbosa F, et al. New techniques for the recovery of small amounts of mature enamel proteins. *J Archaeol Sci.* 2011. 38;3596-3604.
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680–685.
14. Porto I. Laure H. Tykot R. et al. Recovery and Identification of mature enamel proteins in ancient teeth. *Eur J Oral Sci.* 2011;119:83.7.
15. Acil Y, Mobasseri A, Warnke P et al. Detection of mature collagen in human dental enamel. *Cal tis int.* 2005; 76:121-6

LEYENDA DE LA FIGURA

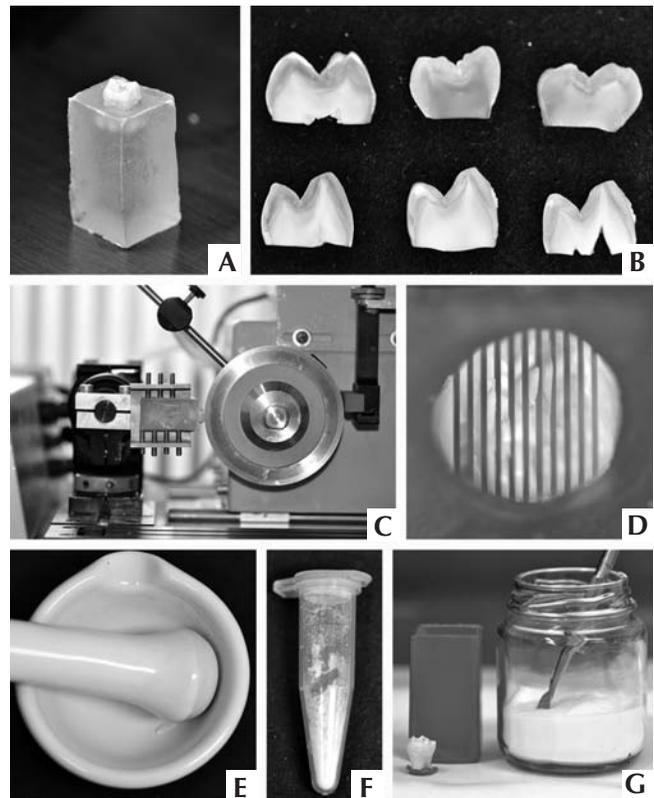


FIGURA 1. Estandarización del corte de dientes en secciones longitudinales de 550 μm A) corte de los tercios medio y apical de la raíz B) montaje en cubos de resina acrílica de autocurado C) posicionamiento en micrótopo Isomet 5000 (Buehler) D) Corona dental con secciones longitudinales de 550 μm E) obtención de secciones individuales y separación mecánica del esmalte y la dentina F) pulverización en mortero de las secciones de esmalte con nitrógeno líquido G) obtención del pulverizado de esmalte dental.

Diente	n	Media peso (g)
Molar Superior	7	0,35
Molar Inferior	8	0,39
Premolar Superior	5	0,21
Premolar Inferior	6	0,19
Canino Superior	3	0,14
Canino Inferior	4	0,11
Lateral Superior	2	0,27
Central Superior	2	0,12
Incisivo Inferior	3	0,04

Tabla 1. Peso medio en gramos, del esmalte dental obtenido por cada grupo dental.

#	Acceso en bases de datos	Nombre de la proteína	Puntaje (protein score)	m/z (relación masa/carga)	Secuencia
28	AMELX_HUMAN	Amelogenina, isoforma X, Homo sapiens	157	309,1737	LPPHPG
27	AMELY_HUMAN	Amelogenina, isoforma Y, Homo Sapiens	117	309,1737	LPPHPG
2	APOA2_HUMAN	Apolipoproteína A-II, Homo sapiens	68	753,0503	AGTELVNFLSYFVELGTQPAT
2	PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxina-6, Homo sapiens	68	407,2519	KKLFPKGVFTKELPSGKK
1	ALBU_HUMAN	Albúmina Sérica, Homo sapiens	60	510,7233	NECFLOHK
19	CO3A1_HUMAN	Colágeno alfa-1(III), Homo sapiens	50	418,722	GAPGPOGPR
28	CO1A1_HUMAN	Colágeno alfa-1(I), Homo sapiens	41	365,6611	DGGRYYY
2	WBS14_HUMAN	Proteína de la región cromosomal 14 del síndrome Williams-Beuren, Homo sapiens	33	402,2144	VSTLSAQP
	ANT3_HUMAN	Antitrombina-III, Homo sapiens	29	651,8538	SEAAASTAVVIAGR
1	CAP1_HUMAN	Proteína 1 asociada a Adenilil ciclasa, Homo sapiens	28	965,5485	LGLVFDVVVIVEIINSK
1	SGIP1_HUMAN	Proteína de interacción con SH3, Homo sapiens	25	495,5795	ADSPAPGPLGPPGPTGP
3	PCDB6_HUMAN	Protocaderina beta-6, Homo sapiens	25	431,2175	LENPLQF
21	AMBN_HUMAN	Ameloblastina, Homo sapiens	23	378,2235	LNAPARL

Tabla 2. Péptidos identificados por LC-MS/MS. Se identificaron 138 péptidos correspondientes a 13 proteínas, 3 de ellas específicas del esmalte (Amelogenina X, Amelogenina Y, Ameloblastina).