



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

CAMPO DEL CONOCIMIENTO DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS: BIOMATERIALES

Impacto biológico y antimicrobiano de nanopartículas de Fe_3O_4 -quitosán en cultivo con células orales

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

ÁNGEL DAVID PAULINO GONZÁLEZ

TUTOR: Dr. RENÉ GARCÍA CONTRERAS Enes León

León, Gto. Noviembre 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

1 Dedicatoria.....	4
2 Agradecimientos	5
3 Lista de abreviaturas.....	6
4 Resumen.....	9
5 Abstract.....	10
6 Introducción.....	11
Capítulo 1.....	14
7 Marco Teórico.....	15
8 Antecedentes.....	27
Capítulo 2.....	30
9 Planteamiento del problema y pregunta de investigación.....	31
10 Justificación.....	32
11 Objetivos: General y específicos.....	33
12 Hipótesis: De investigación y Nula.....	34
Capítulo 3.....	35
13 Marco metodológico: Universo de estudio/muestra, criterios de inclusión, exclusión y eliminación, variables de estudio: dependientes e independientes.....	36
14 Materiales y métodos.....	40
15 Desarrollo de la metodología.....	42

Capítulo 4.....	54
16 Resultados y discusión.....	55
17 Conclusiones.....	72
18 Bibliografía.....	73
19 Anexos.....	78

1 Dedicatoria

A mis padres y a mis hermanos

A mis abuelos

A mis amigos

A los profesores que compartieron conmigo sus conocimientos.

2 Agradecimientos

A mi familia.

A la Universidad Nacional Autónoma De México y a la Escuela Nacional De Estudios Superiores, Unidad León.

Al laboratorio de Investigación interdisciplinaria (LII) de la ENES, León.

A mi tutor Dr. René García Contreras por su apoyo, tiempo y múltiples enseñanzas; por todas las oportunidades que me brindó en este periodo.

A los miembros de mi comité tutor Dr. Julio César Vega Arreguín. y Dr. José Rogelio Scougall Vilchis por sus valiosas observaciones para mejorar mi proyecto.

A los proyectos PAPIIT: IA204516 y PAPIIME: PE201617

A la Dra. Marina Vega González del centro de geociencias de la ENES, Juriquilla por la realización de los análisis DRX y SEM.

A la Mtra. Lourdes Palma Tirado por la realización del análisis TEM.

Al Dr. Julio César Amezcua Romero por su asesoría en la técnica de western blot.

A la Universidad de Meikai y al Dr. Hiroshi Sakagami por la oportunidad de realizar una estancia de investigación en sus laboratorios y adquirir nuevos conocimientos.

A todas las personas que han formado parte de este proyecto, directa o indirectamente.

A mis amigos y compañeros de la maestría, a los miembros del laboratorio.

Al Conacyt y CIESAS por el apoyo brindado durante mis estudios.

3 Lista de abreviaturas

A

Ag: (Del latín *argentum*) Símbolo químico de la plata.

Au: (Del latín *aurum*) Símbolo químico del oro.

B

BSA: (Del inglés *Bovine serum albumine*) Albúmina bovina sérica

C

CC₅₀: Concentración citotóxica media

CO₂: Dióxido de carbono

COX-1: Ciclooxygenasa tipo 1

COX-2: Ciclooxygenasa tipo 2

F

FDA: (Del inglés *Food and drug administration*), Administración de alimentos y drogas.

Fe₃O₄: Óxido de hierro

FT-IR: Infrarrojo con transformada de Fourier

H

HGF: (Del inglés *Human gingival fibroblast*) Fibroblastos gingivales humanos.

HPC: (Del inglés *Human pulp cells*) Células de la pulpa dental humana.

HPLF: (Del inglés *Human periodontal ligament fibroblast*) Fibroblastos del ligamento periodontal humano.

D

DMEM: (Del inglés, *Dulbecco's modified Eagle's medium*) Medio de Eagle modificado por Dulbecco.

DMSO: Dimetil sulfóxido

DRX: Difracción por rayos X

I

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IONs: (Del inglés *iron oxide nanoparticles*) Nanopartículas de óxido de hierro.

ISO: (Del inglés *International organization for standardization*) Organización internacional para la normalización.

M

μ g: Microgramo

mL: Mililitro

μ L: Microlitro

μ m: Microméetro

MTT: Sal de tetrazolio [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio]

N

NPs: Nanopartículas

ng: nanogramo

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

P

PDL: (Del inglés, *population doubling level*) Nivel doble de población.

PGE₂: Prostaglandina E₂.

pH: Potencial de hidrógeno

PBS: Solución salina buffer de fosfato

R

RM: Resonancia magnética

ROS: (Del inglés *reactive oxygen species*) Especies reactivas del oxígeno.

S

SEM: (Del inglés *scannig electron microscopy*) microscopia electrónica de barrido.

SFB: Suero fetal bovino

T

TEM: (Del inglés *Transmission electron microscopy*) Microscopia electrónica de transmisión.

TiO₂: Símbolo químico del dióxido de titanio.

TBS: Buffer tris salino

U

UV-vis: (Del inglés *ultraviolet visible*) Luz ultravioleta visible

V

VSM: (Del inglés *vibranting sample magnetometer*) Magnetómetro de muestra vibrante.

Z

Zn: Símbolo químico del Zinc

4 Resumen

Introducción: La nanotecnología ha tenido un considerable impacto en distintas áreas; la odontología es un campo propicio para el desarrollo y potencial aplicación de dichas alternativas tecnológicas; las nanopartículas de Fe_3O_4 – quitosán poseen características que podrían aplicarse para distintos usos y enfoques en odontología; sin embargo, es necesario evaluar su comportamiento con los sistemas biológicos de la cavidad bucal.

Objetivo: Sintetizar, caracterizar y evaluar el impacto biológico de nanopartículas de Fe_3O_4 – quitosán en células pulpares humanas (HPC), Fibroblastos gingivales humanos (HGF) y fibroblastos de ligamento periodontal humano (HPLF). **Metodología:** Se sintetizaron NPs Fe_3O_4 -quitosán por co-precipitación, se caracterizaron por difracción de rayos X (XRD), espectroscopía infrarroja (FTIR), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopio electrónico de barrido (SEM) y magnetómetro de muestra vibrante (VMS). Se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante prueba MTT en dosis de 0-2.5 mg/mL, detección de especies reactivas de oxígeno (ROS), ELISA para detección de PGE_2 , Western Blot para detección de COX-1 y COX-2, análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo e internalización celular mediante TEM. Se efectuaron pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, t-student y ANOVA- post-hoc de Tukey. El ensayo se realizó por triplicado de tres experimentos independientes. Se fijó un valor $p < 0.05$. **Resultados:** Se obtuvieron nanopartículas con un tamaño promedio < 50 nm, propiedades magnéticas adecuadas, sin alteraciones estadísticamente significativas comparadas con el grupo control en los ensayos de viabilidad celular, la producción de PGE_2 , ROS y ciclooxigenasas mostró valores ligeramente superiores en el grupo de nanopartículas sin quitosán. El ciclo celular y el proceso de internalización celular no mostraron cambios significativos para el grupo de nanopartículas con quitosán. **Conclusión:** Es posible obtener nanopartículas de Fe_3O_4 – quitosán mediante coprecipitación química con adecuada citocompatibilidad en contacto con células orales; es necesario realizar más estudios para potencializar su efecto y establecer un uso seguro y eficiente en odontología.

Palabras clave: Biocompatibilidad, nanopartículas magnéticas, viabilidad.

5 Abstract

Introduction: Nanotechnology has had a considerable impact in different areas; dentistry is a favorable field for the development and potential of application of various technological alternatives; Fe₃O₄ nanoparticles - chitosan specific characteristics that could have different uses and approaches in dentistry; however, it is necessary to evaluate its behavior with the biological systems of the oral cavity. **Aim:** Synthesize, characterize and evaluate the biological impact of Fe₃O₄ - chitosan nanoparticles in human pulp cells (HPC), human gingival fibroblasts (HGF) and human periodontal ligament fibroblasts (HPLF). **Methodology:** Fe₃O₄-chitosan NPs were synthesized by co-precipitation, characterized by X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (IR), transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscope (SEM) and vibrating sample magnetometer (VMS). Cell viability assays were performed by MTT test at a dose of 0-2.5 mg / mL, detection of reactive oxygen species (ROS), ELISA for PGE₂ detection, Western Blot for COX-1 and COX-2 detection, cell cycle analysis by cytometry of flow and internalization process by TEM. Shapiro-Wilk, t-student and ANOVA-post-hoc Tukey normality tests were performed. The test was performed in triplicate of three independent experiments. A value of p <0.05 was set. **Results:** Nanoparticles with an average size <50 nm were obtained, suitable magnetic properties, without statistically significant alterations compared to the control group in the cell viability tests, the production of PGE₂, ROS and cyclooxygenases showed slightly higher values in the group of nanoparticles without chitosan. The cell cycle and the cell internalization process showed no significant changes for chitosan nanoparticles group. **Conclusion:** It is possible to obtain Fe₃O₄ - chitosan nanoparticles by chemical coprecipitation with adequate cytocompatibility in contact with oral cells; further studies are necessary to potentiate its effect and establish a safe and efficient use in dentistry.

Keywords: Biocompatibility, magnetic nanoparticles, viability.

6 Introducción

El campo de la nanotecnología ha tenido un considerable progreso en los últimos años y sus avances se ven reflejados en distintas aplicaciones, desde ámbitos tecnológicos, industriales y biotecnológicos hasta biomédicos. ^(1,2) Aunque se han sintetizado nanopartículas (NPs) de diferentes elementos y compuestos, en años recientes, muchos estudios se han enfocado al empleo de nanopartículas con propiedades magnéticas. ^(3,4)

Cada año aumentan los esfuerzos en la búsqueda de nuevas alternativas y opciones terapéuticas a las terapias tradicionales en diferentes ámbitos, el odontológico no es la excepción, por lo cual una de estas alternativas emergentes es el empleo de NPs de óxido de hierro (NPs Fe_3O_4).⁽⁵⁾ Sin embargo, el efecto citotóxico y los probables efectos secundarios en humanos no se han descrito ni esclarecido ampliamente.^(6,7) La utilización de cultivos celulares *in vitro* es motivo de múltiples publicaciones anualmente, donde se distinguen la evaluación del efecto e impacto biológico de diversos materiales y nanomateriales en el campo de la medicina; particularmente la odontología ha mostrado un crecimiento exponencial en esta línea de investigación.⁽⁸⁾ Específicamente, las células orales son de gran utilidad para determinar la interacción con diversos biomateriales y nanomateriales dentales con el objetivo de identificar los mecanismos citotóxicos y genotóxicos, dichos estudios ayudan a determinar el potencial clínico terapéutico, con base en el uso seguro y responsable^(9,10).

Por otra parte, ante la constante aparición de cepas bacterianas multirresistentes a los principales antibióticos tradicionales (donde la cavidad oral no es ajena a esta problemática), las distintas disciplinas enfocan sus líneas de investigación a la búsqueda y diseño de nuevas alternativas terapéuticas contra distintos microorganismos, sin embargo, la investigación actual demanda obtener la mayor cantidad de información para ponderar el riesgo-beneficio y eficiencia de estas. Los campos convergentes de los nanomateriales y la nanomedicina incluyen la tecnología aplicada a el diagnóstico y el tratamiento de distintas situaciones clínicas. La investigación sobre el desarrollo de la nanotecnología magnética para el suministro y la orientación de los agentes terapéuticos ha surgido en los últimos años y muchos organismos sugieren la necesidad de comprender su comportamiento *in vitro* e *in vivo* para su aplicación en el campo biomédico de forma eficiente. ⁽¹¹⁻¹⁴⁾

Diferentes estudios multidisciplinarios tienen como objetivo dilucidar el impacto toxicológico de las NPs a nivel hematológico, vascular, neurológico, genético y metabólico. ^(3,4)

La implementación de la nanotecnología magnética para distintas aplicaciones como, por ejemplo, la liberación de fármacos en el sitio deseado en el cuerpo permitiría el uso de dosis de fármaco más bajas, lo que contribuiría a una mejora en el tratamiento de las patologías, así como a un menor impacto en el organismo. ⁽⁶⁻⁸⁾

No obstante, al diseñar las NPs, es necesario considerar algunos requisitos asociados con cuestiones fisicoquímicas y de biocompatibilidad. Con respecto a las propiedades fisicoquímicas, se desea que los sistemas basados en estos compuestos nano-magnéticos exhiban características específicas, por ejemplo, un tamaño adecuado permite mejorar la capacidad de extravasación y evita la absorción por el sistema reticuloendotelial, la monodispersidad, minimiza la agregación de NPs en dispersión y el ferri y superparamagnetismo, es necesario para evitar la embolia inducida por la aglomeración en distintos sitios del organismo. ⁽³⁻⁷⁾

La biocompatibilidad también es esencial para la aplicación de nanodispositivos magnéticos en biomedicina, para este propósito, el recubrimiento del núcleo magnético con materiales inorgánicos y poliméricos es una práctica útil y actúa como soporte para distintas biomoléculas en los diferentes ambientes, favoreciendo de forma considerable la biocompatibilidad con los sistemas biológicos y disminuyendo el riesgo de citotoxicidad, además, según la naturaleza de los distintos tipos de recubrimiento pueden favorecer los procesos de excreción y eliminación del organismo. ⁽⁴⁻⁷⁾

La toxicidad de los NPs en las entidades biológicas depende de una amplia gama de factores relacionados con sus propiedades intrínsecas conferidas por la composición química, estructural, la dosis, la vía de administración y el uso previsto, las cuales son solo algunas de las preocupaciones y limitaciones actuales relacionadas con el uso de la nanotecnología en biomedicina, muchas veces propiciado por la falta de estudios e información sobre el impacto toxicológico que estas pueden desencadenar, por lo que tratar de esclarecer y ampliar la información entorno a estas tecnologías resulta fundamental para un uso responsable en el mediano y largo plazo. ⁽¹⁰⁻¹²⁾

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el impacto biológico de NPs de Fe₃O₄ funcionalizadas con quitosán en cultivos con fibroblastos gingivales humanos (HGF), células pulpares humanas (HPC) y células del ligamento periodontal humano (HPLF) y el efecto antimicrobiano en cultivos con *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis*.

El desarrollo experimental fue dividido en 2 fases; 1) síntesis y caracterización del material por técnicas espectroscópicas y microscópicas; 2) evaluación de la interacción y comportamiento biológico del material en contacto con las células orales elegidas para el estudio; mediante técnicas moleculares como ELISA, western blot y citometría de flujo.

Capítulo 1

7 Marco teórico

Generalidades

Nanotecnología y nanopartículas de óxido de hierro

El concepto de nanotecnología fue introducido por Richard Feynman en 1959, desde entonces el abanico de aplicaciones en diversos campos ha mostrado una expansión acelerada. Las partículas utilizadas dentro de la escala nanométrica (1-100 nm) reciben el nombre de nanopartículas (NPs).⁽¹⁵⁾

Se han desarrollado y sintetizado NPs de diferentes elementos para aplicaciones biomédicas, siendo las de plata (Ag), oro (Au), zinc (Zn) y dióxido de titanio (TiO₂) las más comúnmente estudiadas en el campo odontológico. Sin embargo, un grupo de NPs que ha cobrado relevancia en años recientes son las pertenecientes a los óxidos de hierro, principalmente por sus propiedades magnéticas y todas las posibilidades que se derivan de dicha característica.^(16-,17)

En general, los óxidos de hierro pueden encontrarse distribuidos de forma común en la naturaleza y pueden clasificarse como no opacos y opacos, estos últimos incluyen a la ilmenita, hematita, limonita y magnetita entre otros, siendo la magnetita la forma más abundante en la naturaleza y por lo mismo más estudiada. Dentro de los diversos tipos de nanopartículas de óxido de hierro (IONs, del inglés *iron oxide nanoparticles*), como la hematita (α -Fe₂O₃), maghemita (γ -Fe₂O₃) y magnetita (Fe₃O₄) esta última es la más ampliamente utilizada para fines biomédicos debido a su mayor estabilidad y menor grado de oxidación, lo que le confiere mayor biocompatibilidad.^(18,19)

En cuanto al método de síntesis para la obtención de magnetita existen 3 grandes categorías: métodos físicos, químicos y biológicos; dentro de estos grupos se encuentran diferentes rutas y técnicas para su obtención, cada una con sus particularidades, ventajas y desventajas que afectan a diferentes variables como la forma, el tamaño, distribución y, en consecuencia, todas sus demás propiedades, en especial las propiedades magnéticas. La tabla 1 resume de forma general aspectos importantes de algunas de las técnicas de síntesis más comunes.^(7-10,16-20)

Técnica	Tipo	Ventajas	Desventajas	Morfología
Co-precipitación	Químico	Barata, fácil, síntesis en medio acuoso, facilidad de modificar la superficie.	Polidispersidad	Esférica
Sol-Gel	Químico	Control de tamaño y de estructura interna	Alta permeabilidad, unión débil	Esférica
Electroquímica	Químico	Control del tamaño de la partícula	Mayor complejidad, poco reproducible	Esférica, nanorods
Hidrotermal	Químico	Control del tamaño de la partícula	Reproductibilidad complicada	Múltiples formas
Oxidación	Químico	Tamaño uniforme de las partículas	Formación de coloides	Esferas pequeñas y nanorods
Deposición de fase gaseosa	Físico	Fácil de ejecutar	Tamaño difícil de controlar	Nanorods y esferas
Litografía de haz de electrones	Físico	Control del espacio interparticular	Caro, necesidad de equipo muy complejo	Esferas irregulares
Incubación microbiana	Biológico	Escalable, relativamente económico, reproducible	Lento y laborioso	Nanoplatos y esferas

Tabla 1. Comparación de distintas técnicas de síntesis para la obtención de IONs. **Fuente:** Directa.

Aunque existen diversos métodos de síntesis y estos dependen de las características que busquemos para la aplicación final, uno de los métodos más utilizados es el de coprecipitación dado que es relativamente fácil, económico, rápido, escalable y con alta capacidad de reproducibilidad, además dadas las características de los precursores tiene buena solubilidad en agua, lo que lo hace ideal para aplicaciones en el campo biomédico, ya que facilita su redispersión y favorece su interacción con medios acuosos. También es importante mencionar que con el método antes referido se pueden obtener partículas con tamaños menores a 100 nm, dicha característica es importante debido a que se ha reportado que a dicho diámetro presentan propiedades fisicoquímicas muy interesantes, en especial el tipo de comportamiento magnético que presentan. ^(6,7,9,10,15). La magnetita puede presentar ferrimagnetismo y superparamagnetismo, comportamientos que dependen del tamaño y forma de la partícula. La figura 1 muestra los tipos de comportamiento magnético que las nanopartículas de óxido de hierro pueden presentar cuando se exponen a un campo magnético externo. ⁽⁸⁻²⁰⁾

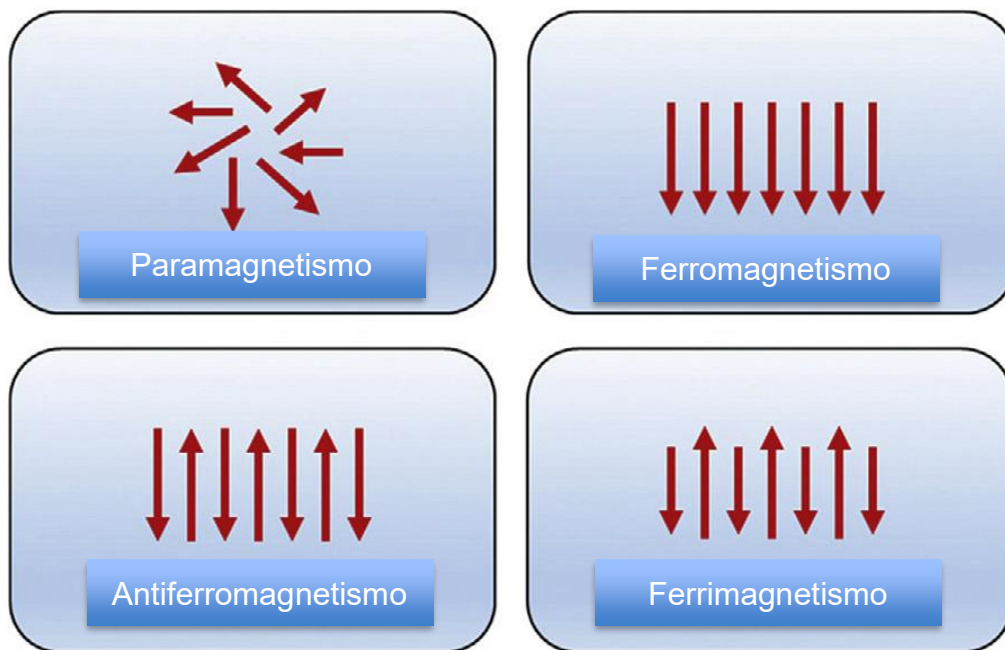


Figura 1. Ordenamiento de los electrones en materiales magnéticos ante un campo magnético externo. **Fuente:** Mohammed L. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: a review. *Particuology*, 2017, 30, 1-14.

Dentro de las múltiples formas que la magnetita puede presentar, la forma de espinela invertida es la que muestra mejores características en cuanto a las propiedades magnéticas, sin embargo, las esféricas conservan un adecuado potencial de magnetización. En cuanto al color característico de la síntesis del material se cataloga como negro grisáceo. ^(20,21)

Debido a la alta energía superficial y a la tendencia a la magnetización que presentan, generalmente las partículas se aglomeran; sin embargo, una de las características estructurales más interesantes está dada por los múltiples sitios que pueden interactuar con diversos grupos funcionales lo cual permite utilizar agentes para recubrir su superficie y disminuir la aglomeración. ^(5-8, 22,23)

Es precisamente la característica de interactuar con diversos compuestos orgánicos e inorgánicos lo que ha derivado que, en los últimos años, la investigación se haya centrado en sus aplicaciones en biomedicina y odontología, destacando: la resonancia magnética como agente de contraste, la liberación controlada de fármacos, la terapia contra el cáncer (hipertermia), la ingeniería de células madre y tejidos. Además, se ha informado sobre posibles efectos antibacterianos favorables cuando son utilizados de forma directa pero también un impacto considerable sobre la reducción en la formación de biofilms bacterianos, cuando son expuestos a un campo magnético externo, disminuyendo el crecimiento bacteriano. Algunas de las principales aplicaciones se esquematizan en la figura 2. ^(5,7,8, 17-20)

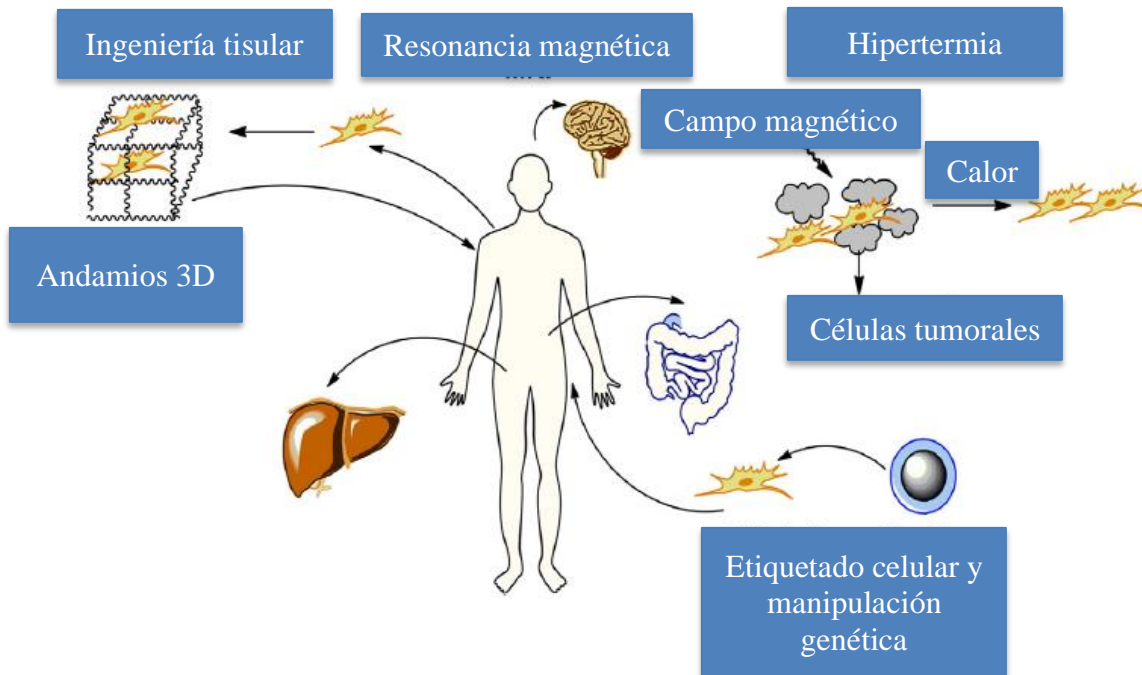


Figura 2. Aplicaciones de las IONPs. **Fuente:** A.M.G.C. Días, A. Hussain, A.S. Marcos, A.C.A. Roque *Biotechnology Advances* 29 (2011) 142–155.

Es importante considerar que, dada su morfología, las NPs pueden interactuar de muchas formas en distintos sistemas biológicos, ya sea a través del sistema inmune, con matrices extracelulares o con proteínas del plasma sanguíneo. Por ejemplo, algunas tendrán la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y otras se eliminarán de forma más acelerada. ⁽⁹⁻¹¹⁾

Otro aspecto importante para destacar son las cargas parciales en la superficie de las NPs ya que tienen relación directa con la interacción que tienen con las células, cargas parciales positivas o negativas afectarán el comportamiento con dichos sistemas biológicos.

Recubrimientos superficiales y Quitosán

Los recubrimientos superficiales de las NPs son utilizados con distintos propósitos, los principales evitar la aglomeración, potencializar las propiedades magnéticas, disminuir su reactividad y aminorar los procesos de oxidación, favorecer los procesos de metabolización y excreción y por supuesto aumentar la biocompatibilidad cuando son diseñadas para

aplicaciones biomédicas. En la tabla 2 se mencionan los principales tipos de compuestos utilizados para la modificación/recubrimiento superficial y algunas de sus características y aplicaciones. ⁽²²⁻³⁰⁾

Compuesto	Tipo	Características/aplicación
Alginato	Orgánico	Carga negativa, Liberación controlada de fármacos, RM
Quitosán	Orgánico	Carga positiva, Liberación controlada de fármacos, RM, hipertermia. Marcador para etiquetado y separación celular.
Dextrano	Orgánico	Carga neutra, vector genético, detección de cáncer de mama y lesiones hepáticas.
Heparina	Orgánico	Carga negativa, quimioterapia, entrega de proteínas al cerebro.
Oro y sílica	Inorgánicos	Agentes de contraste, liberación de fármacos.

Tabla 2. Materiales más comúnmente utilizados para el recubrimiento de NPs de magnetita.

Fuente: Directa.

Las figuras 3 y 4 muestran la conformación estructural general de una nanopartícula modificada y las posibilidades de funcionalización para aplicaciones biológicas, respectivamente.

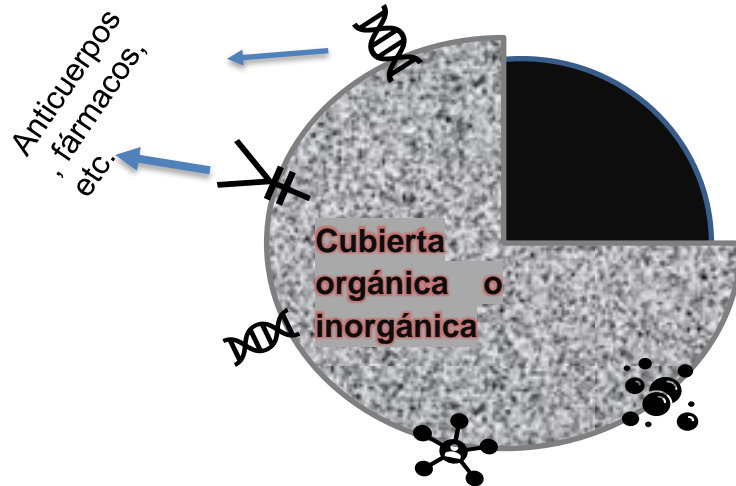


Figura 3. Representación esquemática de la conformación de una nanopartícula magnética para fines biomédicos. **Fuente:** Directa.

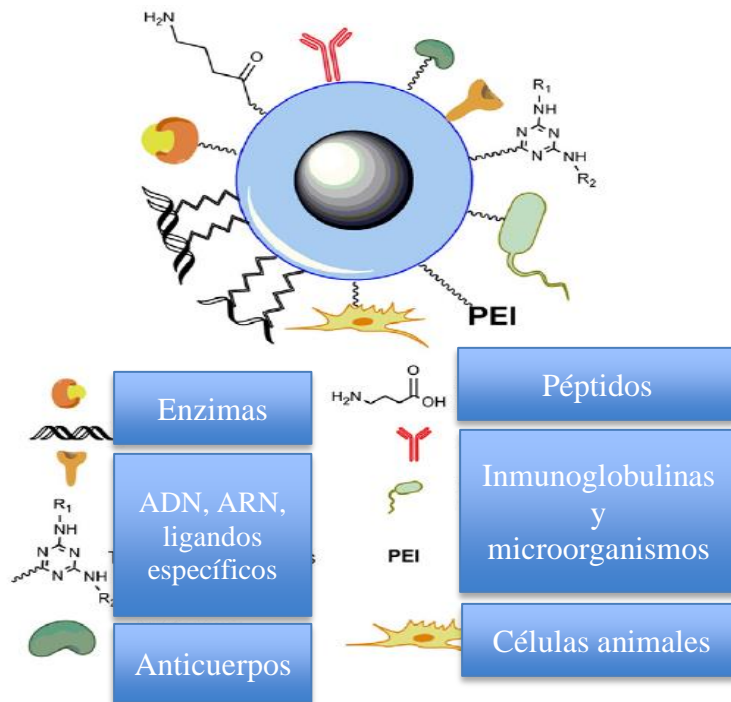


Figura 4. Tipos de moléculas y estructuras para la funcionalización biológica de las NPs. **Fuente:** A.M.G.C. Días, A. Hussain, A.S. Marcos, A.C.A. Roque *Biotechnology Advances* 29 (2011) 142–155.

Dentro de los materiales mencionados, el quitosán es el más utilizado con fines biológicos dadas sus características, algunas se mencionan a continuación. El quitosán es un polisacárido natural, lineal que está conformado por cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada), que se obtiene de la desacetilación de la quitina, proveniente del exoesqueleto de insectos y crustáceos, entre sus propiedades destacan: ser altamente biocompatible, no tóxico, antimicrobiano y biodegradable, cuya composición química (Figura 3) le confiere propiedades como carga parcial positiva, ser altamente hidrofílico y capacidad de interactuar con medios ácidos. Se sabe que el quitosán en combinación con las NPs magnéticas puede mejorar sustancialmente las propiedades térmicas y magnéticas de las mismas, además de proveer mayor estabilidad y disminuir la aglomeración. ⁽²⁴⁻²⁶⁾.

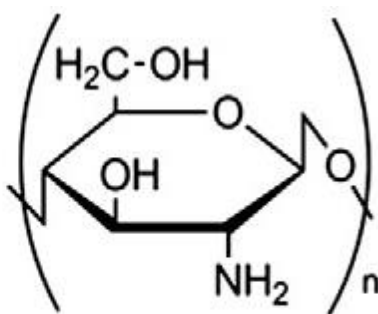


Figura 3. Estructura química del quitosán. **Fuente:** Mcbain, magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of nanomedicine*, 2008: 3(2).

Además, el quitosán es ampliamente utilizado en ingeniería tisular debido a que favorece la adhesión celular y con ello mejora la capacidad de proliferación, por lo que se le ha considerado un bioadhesivo. Es importante mencionar que la FDA lo cataloga como un agente seguro. ⁽²⁶⁾

Biocompatibilidad

En los últimos años diversas dependencias internacionales incluida la Organización Mundial de la Salud (OMS) han alertado sobre la necesidad de vigilar y regular el uso y distribución de materiales nanoestructurados por el surgimiento de los primeros reportes

acerca de la potencial toxicidad de dichos materiales, por lo que la evaluación de la biocompatibilidad resulta fundamental.

La FDA define biocompatibilidad como la habilidad de un dispositivo o material de interactuar con una adecuada respuesta del hospedero en una situación específica. ⁽³¹⁾

Diferentes grupos de investigación y diversas organizaciones, sobre todo europeas y estadounidenses han focalizado sus esfuerzos en realizar un screening exhaustivo del potencial toxicológico de los nanomateriales a diferentes niveles, como el celular y genético. ⁽³²⁻³⁴⁾

Normas internacionales como la ISO proporcionan una guía práctica para la evaluación experimental de la biocompatibilidad de distintos dispositivos tecnológicos diseñados para su implementación en sistemas biológicos, por lo que seguir dichas recomendaciones proporciona mayor validez a los datos obtenidos en el laboratorio. La tabla 3 muestra la clasificación de citotoxicidad de acuerdo con la norma ISO. ⁽³⁵⁾

Viabilidad celular	Categoría
100-75%	No citotóxico
74-50%	Leve
49-25%	Moderado
24-0%	Severo

Tabla 3. Grado de citotoxicidad con relación a la viabilidad celular según la norma ISO.

Fuente: Directa.

Prostaglandina E₂, Ciclooxygenasa 1 y 2 y especies reactivas de oxígeno

Dentro de las múltiples formas de entender y tratar de dilucidar el impacto biológico que los distintos materiales pueden presentar, y en especial las nanopartículas, los mecanismos proinflamatorios que estas pueden desencadenar proporcionan información útil y valiosa

con miras a las hipotéticas aplicaciones para las que son diseñadas, máxime cuando se pretenden utilizar en sitios donde la inflamación juega un papel fundamental, como es la cavidad bucal y por supuesto del organismo en general, en sus procesos homeostáticos. (10-15,32-35)

Entre la amplia gama de proteínas, enzimas y demás mediadores de la inflamación se ha demostrado que la prostaglandina E₂ es una de las moléculas más importantes por las múltiples funciones fisiológicas que desempeña; sin embargo, altos niveles o una sobreproducción afectan de forma notoria los procesos celulares con consecuencias patológicas muy importantes. Específicamente en la cavidad bucal se ha demostrado su implicación en mecanismos de reabsorción ósea como en la periodontitis o la exacerbación de procesos como la gingivitis, dado el panorama anterior resulta sumamente interesante conocer si las nanopartículas en cuestión suponen un aliciente o, por el contrario, un atenuante en la producción de dicha prostaglandina. (36-39)

Por otra parte, las ciclooxigenasas juegan un papel fundamental en la biosíntesis de la PGE₂, ya que actúan como precursores, activadores y potencializadores de la misma.

La Cox-1 desempeña un papel importante en la síntesis de los prostanoides para propósitos fisiológicos y regula funciones como la protección gastrointestinal, la homeostasis vascular, la hemodinámica renal y la función plaquetaria. El gen de la Cox-1 se encuentra en el cromosoma 9. Su lugar en la célula generalmente se encuentra en el citoplasma o cerca del retículo endoplásmico. (33-40)

La Cox-1 se expresa de forma constitutiva en diversos tipos de tejido, sin embargo, sus valores cambian durante las distintas fases del desarrollo y bajo diferentes estímulos y/o condiciones.

Estructuralmente, Cox-1 y Cox-2 tienen una homología mayor al 90%. El peso molecular de Cox-1 es de 69,05 kD y el peso molecular de Cox-2 es de 69,09 kD. (35-37)

Dentro de esta conformación proteica se encuentran dos dominios, uno de estos dominios se une a las membranas formando un canal que permite la entrada del ácido araquidónico,

dando lugar a toda la serie de fenómenos que ello conlleva. Diversas investigaciones consideran a la Cox-1 una enzima constitutiva y a la Cox-2 una forma inducible, aunque también a esta última se le ha encontrado de forma constitutiva en diferentes sitios del aparato reproductor femenino y masculino, en procesos relacionados a la ovulación, implantación, inducción del parto y en general de los procesos reproductivos. Además, se ha relacionado su papel en la transformación cancerosa, principalmente por afectar junto con otras proteínas la resistencia a los mecanismos de control celular como la apoptosis. Finalmente, dentro de la ubicación espacial a nivel celular Cox-2, se encuentra principalmente en la región perinuclear y la membrana nuclear y su gen se localiza en el cromosoma 1. ⁽³³⁻⁴⁰⁾

Por otra parte, las especies reactivas de oxígeno han adquirido una relevancia muy notoria en las investigaciones actuales, sobretodo por sus múltiples funciones fisiológicas y fisiopatológicas con las que se han relacionado, destacando por supuesto, su dualidad benéfica-dañina, ya que es conocido su papel fundamental en distintas vías de señalización celular pero a la vez está demostrado su enorme potencial perjudicial para el funcionamiento celular cuando sus valores se incrementan fuera de los rangos normales. Las moléculas más comunes que conforman este grupo son: Péróxido de hidrogeno (H_2O_2), superóxidos e hidroxilo (OH). Dentro de las múltiples funciones fisiológicas que desempeñan resultan trascendentales en la producción de energía y en procesos inmunológicos como la fagocitosis. Por el contrario, los principales procesos patológicos en los que se ve implicada una alta producción de estas moléculas es en el desarrollo de cáncer, envejecimiento celular y daño al ADN. También se ha postulado que pueden afectar la producción y el funcionamiento de ciertas proteínas. Además, su repercusión en los procesos de reparación tisular e inflamación es innegable, sobre todo en este último mecanismo, en el que propicia una hiperactividad proinflamatoria. ⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾

Finalmente es importante señalar que, aunque estas especies pueden encontrarse en cualquier sitio, ya que son generadas en todos los procesos metabólicos aeróbicos, se encuentran fundamentalmente en los peroxisomas, donde participan en el metabolismo de los lípidos.

8 Antecedentes

El uso de las nanopartículas tiene distintas aplicaciones en el campo de la medicina; particularmente dentro de la odontología su uso ha experimentado un crecimiento acelerado en los últimos años en la aplicación a materiales de restauración para favorecer propiedades adhesivas y antimicrobianas con aplicaciones en el área de la implantología, biomateriales dentales, endodoncia, cirugía bucal, patología bucal y periodoncia.⁽¹⁷⁾ Actualmente, muchas de las investigaciones centran su atención en las NPs con propiedades magnéticas, este grupo incluye NPs de metales puros, aleaciones metálicas y óxidos metálicos (NPs Fe_3O_4),^(18,19) debido a su potencial uso en distintos ámbitos como terapia contra el cáncer, liberación controlada de fármacos, métodos de separación celular, métodos diagnósticos y monitoreo de tratamientos:⁽¹⁹⁾ siendo de especial interés su probable aplicación como alternativa terapéutica en medicina regenerativa e ingeniería tisular, donde se ha demostrado que pueden tener efecto sobre la diferenciación hacia distintos fenotipos celulares por distintas vías de señalización, sobre todo en la diferenciación hacia linajes osteogénicos. ⁽²⁰⁻²³⁾

A la par del desarrollo exponencial de la nanotecnología, el uso de biomateriales con propiedades regenerativas y antimicrobianas se ha incrementado en las últimas décadas, destacando por sus múltiples propiedades el quitosán. Son múltiples las publicaciones anuales sobre la confección de membranas, andamios e hidrogeles teniendo como materia prima a este material en distintos campos biomédicos. En odontología se ha propuesto como un material para la regeneración pulpar, como andamio en cirugía oral y maxilofacial, como tratamiento para estomatitis asociadas a prótesis totales, entre otras aplicaciones. ⁽⁸⁾

Por otra parte, en la microbiota de la cavidad oral se han aislado más de 700 especies, destacando por su prevalencia y relevancia clínica en diversos procesos patológicos especies como *E. faecalis* y *S. aureus*. Las NPs presentan mecanismos de acción microbicida, proporcionando así una alternativa sobre los microorganismos. Actúan principalmente ingresando a la célula alterando las funciones de la membrana celular (lo cual altera la permeabilidad y respiración celular), provocando su muerte. ^(12,13)

Diversos estudios y autores han probado de forma aislada y conjunta las nanopartículas de Fe_3O_4 y el quitosán con distintos objetivos, destacando los estudios en hongos como *cándida* y bacterias como *S. aureus* y *E. coli*. Sin embargo, los resultados suelen ser contrastantes y en ocasiones diametralmente opuestos con posturas a favor y en contra.

En 2015 se sintetizaron a base de sales de hierro NPs de Fe_2^+ y Fe_3^+ en medios alcalinos mediante coprecipitación, por primera vez se encontró que las NPs mostraban actividades antimicrobianas, considerándose como un nuevo nano-antibiótico y especialmente abriendo una opción para ser considerado un agente antituberculoso.⁽³⁹⁾

Por lo general, las nanoestructuras son muy eficientes en la inhibición del crecimiento de bacterias, ya que presentan valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) muy bajos. En diferentes estudios, el valor obtenido de CMI para Fe_3O_4 demostró ser significativamente menor que el obtenido para la solución de diferentes antibióticos.⁽³⁾

Además de lo antes mencionado, en el área odontológica se emplean numerosos materiales, los cuales dependiendo de su aplicación estarán en contacto con diversos tejidos como mucosa, tejido gingival, tejido pulpar, tejido dental duro, tejido óseo, etc. Pero todos tienen en común que en una hipotética aplicación clínica final, estarán en contacto directa o indirectamente con células vivas, por lo que es importante realizar el mayor número de pruebas posible para la obtención de información sobre el impacto que pueden tener sobre las mismas.⁽¹⁰⁻²²⁾

Respecto a los ensayos celulares, desde la década de 1980 ha tomado fuerza la tendencia a realizar cada vez más estudios de citotoxicidad *in vitro* para dar cumplimiento a las recomendaciones de las tres R de Russell de ensayos con modelos animales (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) y también debido a los avances que se han tenido en el campo de la biología celular con los desarrollos en técnicas de cultivos y en métodos y técnicas moleculares.^(6,7,13-15)

La norma ISO 10993 (evaluación biológica de productos sanitarios), describe los diferentes tipos de pruebas a realizar, desde ensayos en cultivos celulares hasta biomodelos animales, sitios de implantación, diseño de muestras a implantar, etc. Esta misma norma recomienda, siempre que en lo posible se deben realizar pruebas preliminares en modelos

celulares. Como tipo celular pueden utilizarse fibroblastos, linfocitos, osteoblastos, etc. Las líneas de células inmortales (continuas) son muy populares por su larga duración y disponibilidad, pero presentan el problema del costo, y que pueden ser menos sensibles a sustancias tóxicas que las células normales (finitas) por esta razón también se utilizan las células provenientes de cultivos primarios adecuadamente obtenidos y en divisiones celulares jóvenes. ⁽¹³⁻¹⁶⁾

Muchos de los ensayos actuales se enfocan a la forma en que los diferentes agentes interactúan con las células a través de la evaluación de los fenómenos que ocurren al estar en contacto por determinado tiempo, diversos estudios se han enfocado en evaluar los efectos citotóxicos de diversas NPs en contacto con células orales, particularmente, existen reportes de las NPs de TiO₂ estudiadas en modelos proinflamatorios gingivales con la evaluación de la expresión de prostaglandina E₂ (PGE₂), ciclooxigenasa (COX) 1 y 2 y análisis metabolómicos con la finalidad de conocer la potencial aplicación en biomateriales dentro y fuera de la cavidad bucal. ⁽¹⁵⁻¹⁶⁾. También se han llevado a cabo estudios para conocer el impacto en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y conocer el potencial de inducción de estrés oxidativo y daño celular, la generación de ROS se ha visto implicado en los efectos citotóxicos y proinflamatorios ocasionados por el contacto de células gingivales humanas y NPs de TiO₂. ^(6,7)

Finalmente, existen algunos artículos de revisión sistemática que permiten conocer de forma general el panorama actual respecto al perfil toxicológico *in vitro* de estas NPs en diversos tipos de células, sin embargo, aún son necesarios más estudios multidisciplinarios sobre los efectos del tratamiento con NPs para obtener información sobre los efectos biológicos de los nanomateriales magnéticos.

Capítulo 2

9 Planteamiento del problema

El uso de nanomateriales y en especial de NPs, se ha incrementado considerablemente en los últimos años para distintas aplicaciones biomédicas. El desarrollo y empleo de estas NPs ha sido exponencial, sin embargo, la evaluación de su impacto biológico en cultivos celulares y el probable riesgo para la salud no ha sido bien estudiado ni esclarecido.^(6,7)

Uno de los principales retos de la odontología contemporánea es el desarrollo de biomateriales que tengan propiedades bioactivas y de biocompatibilidad; teniendo como potencial aplicación el uso de NPs de Fe_3O_4 para estos fines⁽²⁶⁾ Sin embargo, los detalles sobre su impacto biológico en cultivos celulares orales y efectos colaterales no se han establecido ampliamente. No menos relevante resulta la necesidad de introducir nuevas alternativas y agentes terapéuticos ante la creciente incidencia y resistencia de distintos microorganismos.

Como respuesta a la problemática prevalente es posible generar la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el impacto biológico de NPs de Fe_3O_4 funcionalizadas con quitosán en cultivos con celulares orales y cultivos de *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis*?

10 Justificación

Las NPs de Fe_3O_4 son utilizadas para diversos campos y aplicaciones; sin embargo, a la fecha no se han descrito ni esclarecido los mecanismos de interacción con las células orales como: HGF, HPLF y HPC, destacando la relevancia y trascendencia de esta investigación.

Conociendo que el quitosán puede mejorar las propiedades *per se* de las NPs de Fe_3O_4 y con un probable efecto antimicrobiano permitiría un uso más seguro y eficaz que pueda optimizar los beneficios y minimizar los riesgos para ser consideradas como posible alternativa terapéutica.

11 Objetivos

General

Evaluar el impacto biológico de NPs de Fe₃O₄ funcionalizadas con quitosán en cultivos con fibroblastos gingivales humanos (HGF), células pulpares humanas (HPC) y células del ligamento periodontal humano (HPLF) y el efecto antimicrobiano en cultivos con *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis*.

Específicos

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas Fe₃O₄ y Fe₃O₄-quitosán mediante DRX, FTIR, TEM y SEM. Caracterizar nanopartículas Fe₃O₄-quitosán mediante UV-vis.
2. Evaluar el potencial de magnetización de nanopartículas Fe₃O₄-quitosán mediante VSM.
3. Determinar los efectos citotóxicos, concentración de citotoxicidad media (CC₅₀) y capacidad proliferativa de las células orales HPC, HGF y HPLF en contacto con NPs de Fe₃O₄ y Fe₃O₄-quitosán mediante ensayo MTT con base a la norma ISO 10993 (Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity).
4. Cuantificar la producción de PGE₂ del contacto de NPs de Fe₃O₄ y Fe₃O₄-quitosán con las células orales mediante ensayo ELISA.
5. Analizar los niveles de expresión de especies reactivas de oxígeno (ROS) de células orales en contacto con NPs de Fe₃O₄ y Fe₃O₄-quitosán, mediante detección intracelular.
6. Observar el proceso de internalización celular de NPs Fe₃O₄-quitosán en HGF, HPC y HPLF mediante TEM.
7. Observar y comparar la expresión de COX-1 y COX-2 de las células orales HPC y HGF después del contacto con NPs de Fe₃O₄ y Fe₃O₄-quitosán mediante Western Blot.
8. Evaluar del efecto antimicrobiano (curva mínima inhibitoria) de las NPs en cultivos con *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis* mediante el método de microdilución en caldo.
9. Analizar el impacto sobre el ciclo celular de NPs Fe₃O₄-quitosán en HGF mediante citometría de flujo.

12 Hipótesis

Hipótesis de investigación

Las NPs de Fe₃O₄-quitosán, muestran una adecuada citocompatibilidad con células orales; mostrando un efecto antimicrobiano, sin alterar su expresión de citoquinas proinflamatorias y estrés oxidativo comparadas con NPs de Fe₃O₄ y tienen un potencial uso en odontología.

Hipótesis Nula

Las NPs de Fe₃O₄-quitosán no muestran una adecuada citocompatibilidad con células orales, no muestran un efecto antimicrobiano y alteran la expresión de citoquinas proinflamatorias y estrés oxidativo comparadas con NPs de Fe₃O₄ sin un potencial uso en odontología.

CAPÍTULO 3

13 Marco Metodológico

Tipo de estudio: experimental *in vitro*

Diseño de estudio: Descriptivo, prospectivo y comparativo

Universo de estudio/ Muestra

Universo de estudio:

A. NPs Fe₃O₄ y NPs Fe₃O₄-quitosán

B. Número de células orales cultivadas y establecidas de tejidos orales humanos.

C. Microorganismos: *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis*

Muestra: No probabilística.

Tamaño de muestra: n= 9, triplicado de experimentos independientes.

Criterios de inclusión

Nanopartículas de Fe₃O₄ sintetizadas por el método de coprecipitación.

Muestras caracterizadas por DRX y SEM que muestren el recubrimiento superficial con quitosán.

Células con un PDL <15

Criterios de exclusión:

Nanopartículas con propiedades magnéticas en fase distinta a la magnetita.

Muestras que no presenten propiedades magnéticas al interactuar con el quitosán.

Células con un PDL >15

Criterios de eliminación

Cultivos celulares y/o bacterianos contaminados.

Muestras que de forma visible muestren un cambio de color que indique sobreoxidación.

Variables de estudios**Variables dependientes**

Variable	Definición	Definición operacional	Tipo de variable	Escala y unidad de medición	Análisis estadístico
Citotoxicidad	Efecto de una sustancia sea muerte o proliferación celular.	Se utilizaron cultivos con HGF, HPC y HPLF en contacto con NPs Fe ₃ O ₄ funcionalizadas con y sin quitosán. Se usó el ensayo MTT para su análisis de viabilidad celular	Cuantitativa continua	De razón 0-n células/mL	t-student pareada y ANOVA post hoc de Tukey
Efecto anti-microbiano (Concentración mínima inhibitoria)	Acción de una sustancia por destrucción o inhibición del crecimiento de microorganismos a la concentración más baja.	Se utilizó el método de microdiución en caldo.	Cuantitativa continua	De razón 0-n células/mL	ANOVA

Variables independientes:

Variable	Definición	Definición operacional	Tipo de variable	Escala y unidad de medición	Análisis estadístico
Tipo de NPs	Partículas magnéticas con y sin adición de quitosán.	Se adicionaron NPs a diferentes concentraciones al medio de cultivo.	Cualitativa	Nominal Dicotómica 1- NPs Fe ₃ O ₄ 2. NPs Fe ₃ O ₄ + Quitosán	t-student
Tiempo de proliferación celular	Incremento del número de células por división celular cuantificadas por medio de conteo celular con hematómetro.	Rango temporal a partir de la incubación con NPs.	Cuantitativa discreta	De razón 0-n horas de incubación	t-student pareada
Expresión de ROS	Cantidad de especies reactivas de oxígeno producidas por la célula en contacto con las NPs.	Se utilizó análisis fluorométrico de detección intracelular.	Cuantitativa Continua	De razones 0-n absorbancia	t-student pareada

Expresión de PGE ₂	Cantidad de Prostaglandina Producida por la célula bajo estímulo.	Se utilizó el ensayo ELISA	Cuantitativa continua	De razones 0-n PGE ₂ ng/mL	t-student pareada
Producción de COX-1 y COX-2	Expresión de proteínas pro-inflamatorias producidas por las células en contacto con las NPs.	Se utilizó el análisis Western Blot	Cualitativa	Nominal dicotómica 1-Presencia 2-Ausencia	χ ² cuadrada
Internalización celular	Mecanismo por el cual una célula introduce sustancias o materiales externos.	Se utilizaron cortes analizados por TEM.	Cualitativa	Nominal dicotómica 1.Internalizada 2. No internalizada	χ ² cuadrada
Análisis del ciclo celular	Conjunto de eventos de crecimiento, replicación y división de una célula.	Se utilizó citometría de flujo y tinción con yoduro de propidio.	Cuantitativa continua	De razones 0-n cantidad de ADN /fase	t-student

14 Materiales y Métodos

Materiales

Equipo: Campana de flujo laminar horizontal (Lumistell MR LH-120, Celaya, Guanajuato, México), microscopio de contraste de fases (Leica AxioCamp MRc, Wetzlar, Alemania), centrifugadora (Beckman®, J2-MC, Indianápolis, EUA), incubadora (Binder®, Tuttlingen, Alemania), ultracongelador (Thermo Scientific®, Rochester, NY, EUA), cámara de Neubauer (Bioeco®, Alemania), espectrofotómetro (Thermo Scientific®, Finlandia), microscopio SEM (JEOL JSM-6360, Co., Ltd Akishima, Tokio, Japón), microscopio TEM (JEOL JEM-1010, Co., Ltd Akishima, Tokio, Japón), difractómetro Miniflex (Rigaku corporation, Texas, USA), espectrómetro infrarrojo Spectrum 100 Perkin Elmer (Billerica, Massachusetts, USA), escáner C-Digit blot (Li-Cor) y citómetro de flujo (SH800 Series; SONY Imaging Products and Solutions Inc., Kanagawa, Japan).

Instrumental

Micropipetas (Thermo Scientific®, Rochester, NY, EUA), cajas de cultivo de 10-cm y 6-cm (Thermo Scientific Rochester, NY, EUA), placas de cultivo de 96 micropocillos (Thermo Scientific Rochester, NY, EUA) y filtradores celulares Falcon® (40 µm) (Corning, NY, USA).

Insumos

Buffer de fosfato (PBS, pH 7.4), suero fetal bovino (SFB) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA) al 10%, tripsina al 0,05% (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), penicilina/estreptomicina 10,000UI/mL y 10,000µg/mL (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), glutamax (Life Technologies, Gibco)dimetilsulfóxido (DMSO, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), hexahidrato de cloruro férrico (Karal,León,Gto,México),quitosán (Sigma-Aldrich), kit de detección de ROS Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), kit de ELISA (Enzo Life Sciences New York, USA), interleucina 1 beta (IL-1β) (Novus Biologicals, LL, Briarwood, USA), Araldite M (CIBA-GEIGY; NISSHIN EN Co., Ltd., Tokio, Japón), buffer RIPA 1X (life technologies,Carlsbad,California,USA), membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF)

(Inmobilon Millipore, Burlington, Massachusetts, USA), azul de Comassie (Bio-rad laboratories, Hercules, California, USA), buffer de carga Laemmli 2x (Bio-rad laboratories, Hercules, California, USA), marcador de peso molecular (Bio-rad laboratories, Hercules, California, USA), anticuerpo primario monoclonal de ratón Cox-1 y Cox-2 (Sigma-aldrich, St. Louis, USA) y anticuerpo secundario anti-ratón con peroxidasa de rábano (Sigma-aldrich, St. Louis, USA).

15 Desarrollo de la metodología

Síntesis y caracterización de Nanopartículas

Las nanopartículas de magnetita fueron sintetizadas por coprecipitación. Se colocaron 1.6 g de cloruro férrico hexahidrato (peso molecular = 270.30) y 0.9 g de cloruro ferroso tetrahidrato (peso molecular = 198.81) en un matraz, se agregaron simultáneamente 40 mL de agua desionizada, la solución se mantuvo bajo agitación magnética por 10 minutos, luego se agregaron 5 mL de NH_4OH por goteo hasta que se obtuvo un precipitado. El precipitado se separó con un imán y se lavó 1 vez con etanol y 3 veces con agua desionizada para eliminar los restos de hidróxido de amonio.

Las partículas se secaron a 35 °C en una parrilla térmica. Luego, se agregó la solución de quitosán preparada previamente, para la cual se disolvieron 5 mg de quitosán (Sigma-Aldrich) al 70% de desacetilación en 25 mL de agua desionizada con ácido acético al 0.5%. Se pesaron 300 mg de las nanopartículas obtenidas y se agregaron a la solución de quitosán, se mantuvieron durante la noche bajo agitación a 25 °C, al añadir la solución de quitosán se observó un cambio de color de la solución de negro a marrón, lo cual es un indicativo cualitativo de la interacción entre las nanopartículas y el quitosán. La Figura 5 muestra un resumen de la metodología empleada para la síntesis del material.

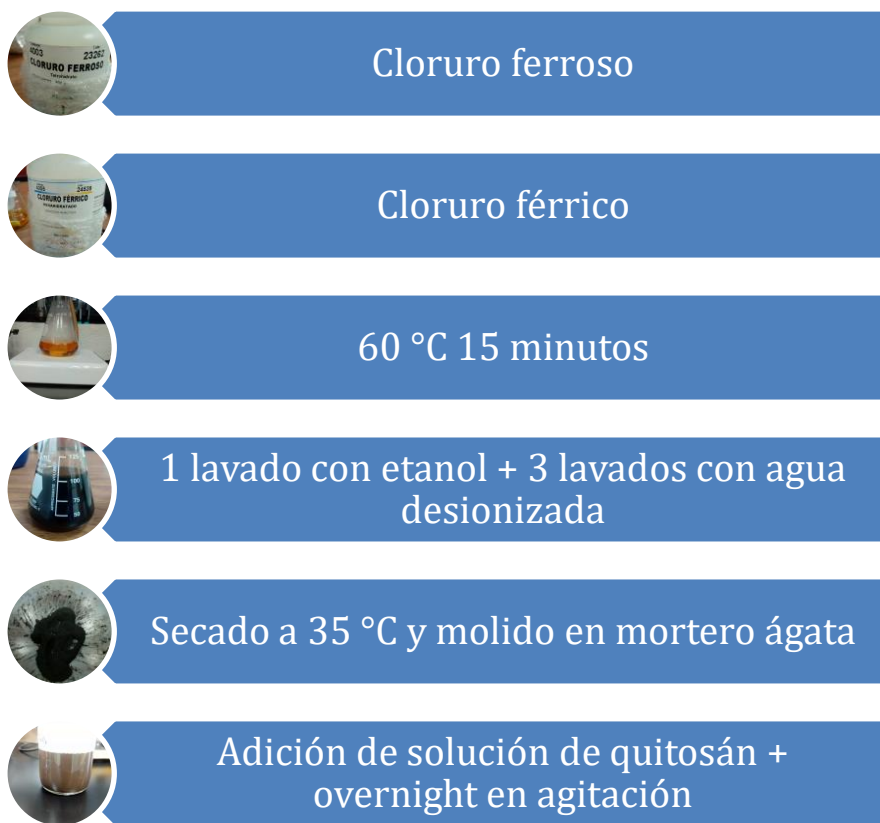


Figura 5. Método de coprecipitación seguido para la obtención del material. **Fuente:** Directa.

Caracterización de muestras

Microscopía electrónica de barrido y de transmisión (SEM y TEM)

Las técnicas de microscopía SEM y TEM se utilizaron para evaluar el tamaño de partícula, la distribución y la morfología de las muestras. Las muestras de ambos grupos se evaluaron mediante el equipo de microscopía SEM a un voltaje de aceleración de 20 kV a 10.000X.

Las nanopartículas de ambos grupos se suspendieron en alcohol isopropílico (2-propanol), se colocó una gota de esta solución en una rejilla de cobre recubierta de carbono y se analizaron en un equipo de microscopía TEM operado a una aceleración de 80 kV a 100 nm. El diámetro promedio de las nanopartículas se obtuvo a través de mediciones de micrografías TEM utilizando el software Image-J, un total de 25 partículas fueron analizadas para cada grupo, los datos fueron graficados en el paquete estadístico OriginLab en donde se observaron las distribuciones de frecuencias.

Difracción de rayos X (DRX)

Las muestras en forma de polvo se midieron en un difractómetro Miniflex con radiación de cobre $K\alpha$ 1.5406Å en un intervalo de 5 a 80 grados, en ángulo 2θ a un paso de 0.02 grados con un tiempo de conteo de 0.06 s por punto. Los patrones de difracción presentados fueron suavizados y se les sustrajo el fondo con el fin de identificar mejor las fases presentes.

Espectrometría infrarroja (FT-IR)

Los cambios en los grupos/enlaces químicos presentes en ambos grupos de nanopartículas fueron analizados usando espectrometría infrarroja con transformada de Fourier con el equipo Spectrum 100 Perkin Elmer utilizando el dispositivo de reflectancia total atenuada (RTA) en pastilla con bromuro de potasio grado espectroscopía en un rango de longitud de onda de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, se utilizó un láser de longitud de onda de 632.8 nm.

Magnetometría de muestra vibrante (VSM)

Para identificar el potencial de magnetización de la muestra de nanopartículas una vez recubierta con el quitosán se utilizó el magnetómetro MPSS XL-7, para la obtención de la curva de magnetización la muestra fue analizada a temperatura ambiente y comparada con referencias de otros autores establecidas previamente.

Espectroscopía UV-vis

Se colocaron 400 μL de las nanopartículas de Fe_3O_4 -quitosán obtenidas y 600 μL de agua bidestilada en celdas de cuarzo, la muestra fue analizada con el espectrofotómetro de UV-visible Multiskan TM GO, a una longitud de onda de 200-800 nm para determinar la absorbancia.

Ensayo de Citotoxicidad y determinación de CC₅₀.

Bioensayo de colorimetría Rápida MTT

Para evaluar el impacto de las nanopartículas sintetizadas en células humanas de la cavidad oral se utilizaron fibroblastos gingivales humanos (HGF), células de la pulpa humana (HPC) y fibroblastos de ligamento periodontal humano (HPDL) provenientes del banco de criopreservación celular de la Escuela Nacional de Estudios superiores unidad León de la UNAM, la obtención y el uso de dichas células cuenta con la previa aprobación del Comité de Bioética de la misma institución (CE_16/005_SN). Se enfatizó en utilizar en todos los experimentos células con un PDL <15, para las 3 líneas celulares.

En cada experimento se inocularon 100 µL de medio que contenían en promedio 25×10^4 células en placas de cultivo de 96 micropocillos con medio suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 UI / mL de penicilina, 100 mg / mL de estreptomina y 1% de Glutamax. Los platos se incubaron por 48 horas a 37 ° C en una atmósfera húmeda al 95% y 5% de CO₂ para permitir la correcta adhesión celular focal previa a la inoculación de las muestras.

Posterior a dicho periodo de crecimiento, las muestras de los grupos de estudio se resuspendieron en medio DMEM para obtener una concentración inicial de 2.5 mg/mL, se utilizó un osmómetro para medir la osmolaridad de las muestras, obteniendo un valor de 512m Osm y 412mOsm para las muestras cubiertas por quitosán y sin quitosán, respectivamente, también se utilizó el pH-metro para la identificación de los valores iniciales del pH de las muestras, los cuales fueron 6.5 y 5.4 respectivamente. El medio de cultivo inicial fue reemplazado por medio fresco y se inocularon 100 µL de las muestras de ambos grupos realizando diluciones seriadas para obtener la curva de dosis - respuesta en un rango de 0-2.5 mg/mL, con un grupo control para cada línea celular. Las células fueron incubadas durante 24 horas bajo las mismas condiciones descritas previamente. Posterior a dicho periodo de contacto directo, el número relativo de células viables se determinó mediante el método MTT [bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio], disolviendo 0,2 mg / mL en medio DMEM, el medio con las muestras fue removido con bomba de vacío y se agregaron 100 µL del medio que contenía el MTT, las

placas se incubaron durante 4 horas a 37°C en una atmósfera húmeda al 95% y 5% de CO₂. Se tomaron microfotografías con el microscopio de contraste de fases.

Después de reemplazar el medio, el formazán se disolvió completamente con 100 µL de DMSO y luego se analizó a 570 nm con el lector de microplacas Multiskan TM GO.

La CC₅₀ se determinó a partir de la curva de dosis-respuesta de cada tipo de célula calculando a partir de los tres experimentos independientes.

Ensayo proinflamatorio mediante kit ELISA para detección de PGE₂

Para la detección de PGE₂ se utilizó un kit de ELISA; las 3 líneas celulares fueron inoculadas con 3 dosis distintas (0, 0.31.0.62 y 1.25 mg/mL) de acuerdo con los datos obtenidos previamente en la curva de dosis respuesta, ambos grupos de nanopartículas fueron utilizados para llevara a cabo el ensayo. Se siguió el protocolo descrito previamente para la inoculación de las células a la densidad requerida y el contacto con las muestras se realizó durante 24 horas, se utilizó la interleucina 1 beta (IL-1β) a una concentración de 3 ng/mL durante 48 horas como control positivo y las células sin la exposición a las nanopartículas ni a la IL-1β se utilizaron como control negativo. Posterior a este periodo de incubación se recolectó el sobrenadante de todas las muestras para evaluar la cantidad producida de PGE₂ y se siguió el protocolo descrito por el fabricante para la ejecución del ensayo. La curva estándar se realizó en 7 tubos para centrifuga de 15 mL con diferentes concentraciones de PGE₂ para poder realizar la comparación con la concentración de las muestras de interés. Se utilizó para el diseño del experimento el microplato de 96 pocillos incluido en el kit, se colocaron 100 µL de las muestras y 100 µL de los estándares en los pocillos con los respectivos controles como se indica en la figura. Se agregaron 50 µL del conjugado y 50 µL del anticuerpo en los pocillos indicados por el fabricante. El plato fue cubierto de la luz y se incubó durante 2 horas en agitación a 500 rpm. Posteriormente se realizaron 3 lavados con la solución incluida en el kit, se retiró completamente dicha solución y se agregaron 200 µL del sustrato en los pocillos señalados en el protocolo y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Se agregaron 50 µL de la solución stop y el plato fue leído inmediatamente a 405 nm en el espectrofotómetro de UV-visible Multiskan TM GO. El ensayo fue corrido en duplicado como lo indica el fabricante.

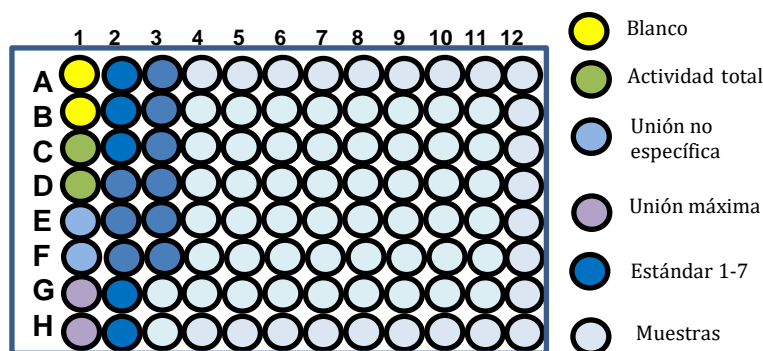


Figura 6. Metodología empleada para la ejecución del ensayo ELISA. **Fuente:** Directa. **Ensayo de detección fluorométrica intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS).**

La detección de la producción intracelular de ROS en las 3 líneas celulares y para ambos grupos de estudio se realizó con el kit de Sigma-Aldrich. Se inoculó una densidad de 4×10^5 células/mL en un microplato de 96 pocillos y se incubaron según el protocolo descrito para los experimentos anteriores. Se incubaron durante 24 horas; posteriormente se realizó la preparación de la solución de reacción mezclando 20 μ L de la solución stock del agente de detección de ROS y 10 mL del buffer de ensayo. Se agregaron 100 μ L de la solución de reacción a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante una hora. Se agregaron 20 μ L de nanopartículas a cada pocillo empleando una única dosis para las 3 líneas celulares (1.25 mg/ mL). Como control positivo se añadieron 4 μ L de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y como control negativo se utilizaron células sin ningún tratamiento añadiendo únicamente el volumen correspondiente de medio. Para inducir la producción de ROS se incubó durante 1 hora a 37°C. La medición fue realizada en el espectrofotómetro de UV-visible Multiskan TM GO realizando el ajuste entre el valor obtenido a 490 nm entre el valor obtenido de la lectura a 520 nm. El ensayo fue corrido en duplicado según lo indicado por el fabricante.

Internalización celular para muestras de Fe₃O₄-quitosán

Se inocularon 25×10^4 células de HPC, HGF y HPLF en cajas de cultivo de 10 cm y se incubaron durante 48 horas bajo las condiciones referidas anteriormente. Las células fueron tratadas con 2.5 y 0.15 mg / mL de Fe₃O₄-quitosán resuspendidas en medio DMEM, durante 3 horas. Después se lavaron tres veces con PBS para remover completamente las partículas y evitar la contaminación con las mismas en los pasos subsecuentes. Las células se fijaron durante 1 hora con glutaraldehído al 2% en tampón de cacodilato 0,1 M (pH 7,4) a 4 ° C. Inmediatamente después, las células se rasparon con espátulas de goma, enfatizando realizar este raspado por toda la superficie y circunferencia de la caja para desprender el mayor número de células, las células se fijaron posteriormente durante 90 minutos con tetraóxido de osmio al 1% y tampón de cacodilato 0,1 M (pH 7,4), se deshidrataron y se incluyeron en Araldite M (CIBA-GEIGY; NISSHIN EN Co., Ltd., Tokio, Japón). Las secciones finas se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y luego se observaron bajo un microscopio electrónico de transmisión JEM-1210, en el Laboratorio de Óptica Electrónica de la Universidad de Meikai, Sakado, Japón (JEOL, Co., Ltd Akishima, Tokio, Japón) con un aumento de $\times 5,000$ y una aceleración de 100 kV.

Western Blot

El protocolo utilizado para la realización del Western Blot se describe a continuación.

Se inocularon 4×10^5 células/mL de HPC y HGF en un plato de 6 pocillos, las células se incubaron durante 48 horas, al termino de dicho periodo se reemplazó el medio y las muestras fueron añadidas en las dosis seleccionadas y utilizando como control negativo células sin tratamiento y células inflamadas con interleucina 1 β como control positivo.

Las células se incubaron durante 24 horas. Después de dicho periodo se realizó la lisis y extracción de proteínas, para lo cual las células fueron lavadas 3 veces con PBS, se añadieron 300 μ L de buffer RIPA 1X a cada pocillo y se incubaron en hielo frappé durante 15 minutos. Las células se rasparon con una espátula flexible estéril, los platos se observaron al microscopio para confirmar el desprendimiento del mayor número de células y fueron colectadas en tubos para centrifuga, se sonicaron durante 15 segundos

y centrifugadas a 12 rpm a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y transportado a un nuevo tubo Eppendorf®. Las muestras se almacenaron a -20°C.

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el método de Bradford, utilizando albúmina bovina sérica para realizar la curva *standard*, las distintas diluciones cargadas con diferentes concentraciones de la proteína fueron leídas a 595 nm en el espectrofotómetro, los datos fueron graficados y se obtuvieron la regresión lineal de la curva y la ecuación de la recta fue utilizada para calcular la concentración de las muestras. El valor R^2 del ajuste lineal fue de 0.98.

Para la ejecución de la electroforesis se utilizó la técnica SDS-PAGE, usando un gel de poliacrilamida al 12%. Utilizando la curva estándar se determinó cargar 30 µg/µL de proteína de cada una de las muestras a analizar. Previo a la carga en el gel, todas las muestras se prepararon utilizando el buffer de carga Laemmli 2x con mercaptoetanol, se centrifugaron por 5 segundos y se calentaron durante 5 minutos a 100°C. El primer pocillo del gel fue reservado para añadir 10 µL de marcador de peso molecular. Después de añadir el resto de las muestras el gel se corrió a 200 V durante 45 minutos. Después se realizó la transferencia húmeda a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) a 100 V durante 45 minutos. El gel fue teñido con azul de Coomassie para comprobar que la transferencia de las proteínas a la membrana resultaba efectiva. Después se realizaron 2 lavados de la membrana con solución TBS 1X más tween 20 al 1% y se agregó la solución de bloqueo compuesta por 1.5 g de leche desgrasada más 30 mL de solución TBS 1X, se dejó durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos en agitación con solución TBS 1X más tween 20 al 1%. Se añadió el anticuerpo primario monoclonal de ratón Cox-1 o Cox-2 según las diluciones de trabajo indicadas por el fabricante. El anticuerpo primario fue preparado en solución TBST 1X sin tween más leche desgrasada, se añadieron 10 µL de azida de sodio para evitar la contaminación de la membrana y se mantuvo en agitación por overnight con el recipiente cubierto para evitar la evaporación de la solución. El anticuerpo secundario anti-ratón con peroxidasa de rábano se agregó después de realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS 1X más tween 20 al 1%. El anticuerpo se diluyó en TBST 1X sin más leche desgrasada según las indicaciones del fabricante y se mantuvo durante 1 hora en agitación. Posteriormente la membrana fue lavada 3 veces con solución

TBS 1X más tween 20 al 1%. La membrana fue colocada durante 5 minutos en un contenedor plástico con solución quimiolumisecente PREMIUM LI-COR preparada según las indicaciones del fabricante (relación 1:1). La membrana fue colocada inmediatamente en el escáner C-Digit blot y analizada con el software image studio versión 4.0 para la obtención de las imágenes.

Ensayo de microdilución en caldo

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se obtuvieron de la colección de cultivo de stock del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los experimentos sobre la actividad antimicrobiana se llevaron a cabo según lo descrito por el Instituto de estándares clínicos y de laboratorio [M.A. Wikler, Métodos para la dilución de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias que crecen aeróbicamente, (2009) Estándar aprobado M7-A7, CLSI]. La actividad antimicrobiana de ambos grupos de nanopartículas se probó contra la bacteria patógena humana *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Enterococos faecalis* (*E. faecalis*). Se utilizaron medios selectivos para cada cepa de cultivo y luego se cultivaron en medio no selectivo. Cada cepa se incubó a 37 ° C durante 24 h para los cultivos jóvenes, que se utilizaron para preparar los estándares de McFarland en relación 1:20 utilizando solución salina. Ambos grupos se inocularon a diferentes concentraciones partiendo de una dosis inicial de 2.5 mg /mL con la finalidad de homogeneizar las dosis empleadas en células y bacterias y hacer una comparación de los efectos provocados. Se utilizaron los siguientes controles: el control positivo consistió en medio de caldo y bacterias, control negativo se utilizó caldo estéril, además se emplearon también como controles quitosán y ceftriaxona. La concentración final fue de aproximadamente 5×10^5 UFC / mL. Las microplacas se incubaron a 37 ° C durante 24 horas en una incubadora agitada a 200 rpm. La presencia o ausencia de turbidez en cada pocillo se observó de forma cualitativa y además se confirmó mediante el análisis de la densidad óptica en el espectrofotómetro de microplacas a las longitudes de onda correspondientes para cada bacteria *Staphylococcus aureus* (625 nm), *Escherichia coli* (570 nm) y *Enterococos faecalis* (450 nm). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó a partir de las diferentes diluciones seriadas de las nanopartículas en contacto con bacterias. Los resultados se expresaron como un porcentaje de las bacterias viables

en comparación con el grupo control no tratado. Luego, se subcultivaron 5 µl de dilución de los pocillos en placas de agar Mueller-Hinton, para corroborar los datos obtenidos de la lectura de densidad óptica antes mencionada.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Para evaluar el impacto de las NPs en el ciclo celular y la posible inducción de apoptosis se utilizaron aproximadamente 10^6 células de HGF (PDL <15), se trataron con 1.5 mg/mL de NPs de Fe₃O₄-quitosán, un control negativo de células no tratadas y un control positivo con actinomicina D como inductor de apoptosis (1 µM). Las células fueron recolectadas y fijadas con 1% de paraformaldehído en PBS sin iones de calcio y magnesio [PBS (-)] durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con PBS (-) y tratadas durante 30 min con 400 µL de 0.2 mg/mL de ribonucleasa A (precalentada durante 10 min a 100 °C para inactivar la desoxirribonucleasa) para degradar el ARN. Después las células fueron centrifugadas y el pellet recolectado fue lavado dos veces con PBS (-) y teñido durante 15 minutos con yoduro de propidio al 0.01% con 0.01% de NP-40 en PBS (-) para prevenir la agregación celular. Después se utilizaron los filtradores celulares Falcon® (40 µm) para remover las células agregadas y permitir un mejor análisis, las células teñidas con yoduro de propidio fueron analizadas en el citómetro de flujo. El análisis del ciclo celular se realizó mediante el Software Cell Sorter versión 2.1.2. (SONY Imaging Products and Solution Inc.).

La figura 7 muestra un resumen de la metodología empleada durante el desarrollo del proyecto.

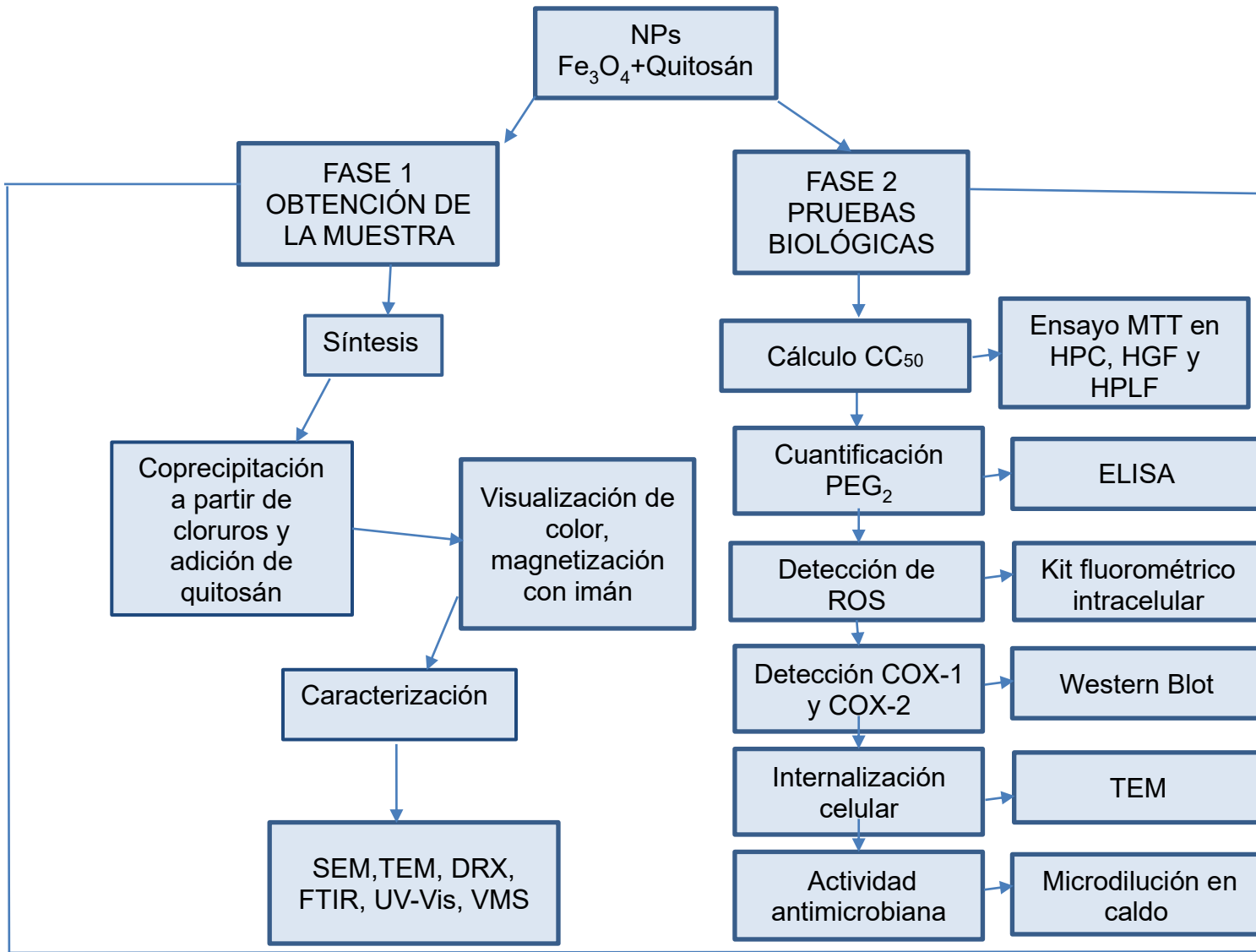


Figura 7. Fases 1 y 2 experimentales, se esquematizan los ensayos empleados para el estudio de cada variable planteada. **Fuente:** Directa.

Análisis estadístico

La estadística descriptiva se representa en media, desviación estándar y porcentajes. Todos los ensayos fueron analizados mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, posteriormente se realizaron la prueba t de Student y ANOVA de una vía seguido del test post-hoc de Tukey. Los experimentos fueron realizados por triplicado de forma independiente. Se fijó un valor $p < 0,05$ para las pruebas de hipótesis. Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA).

CAPÍTULO 4

16 Resultados y discusión

Síntesis y caracterización de muestras

Coprecipitación y microscopía electrónica de barrido y de transmisión (SEM y TEM)

El material obtenido mediante la técnica de coprecipitación mostró el color característico negro-grisáceo, con un ligero cambio a marrón al adicionarse el quitosán. La morfología resultó mayoritariamente esférica para ambos grupos según los análisis por TEM (figura 8a y 8d) y se puede observar que la adición del quitosán permite una mejor dispersión interparticular explicado muy probablemente al disminuir la aglomeración entre partículas, fenómeno previamente señalado en diversos estudios ⁽⁴²⁻⁴⁸⁾; las imágenes obtenidas por SEM corroboran este hecho (figura 8b y 8e). Por otra parte, como puede observarse en las gráficas de la figura 8 el tamaño promedio para el grupo de NPs sin quitosán fue de 20.24 ± 6.54 nm, (figura 8f) en tanto el tamaño de partícula promedio para el grupo con recubrimiento de quitosán fue de 24.4 ± 7.04 nm, (figura 8c) indicativo de que existe cierta polidispersidad en el material sintetizado, lo cual está en concordancia con estudios previos respecto al empleo del método de síntesis empleado en el presente estudio. ⁽⁴⁶⁻⁵⁰⁾ Asimismo, es evidente que la adición del quitosán aumenta el tamaño de la partícula, sin embargo, este aumento no resulta significativo y es también un cambio que está dentro de los rangos que autores previos como Nhera et.al han reportado, señalando que la adición de quitosán puede aumentar el tamaño de partícula entre 3-20 nm, en el caso del presente trabajo este aumento del tamaño resultó el esperado, no obstante de acuerdo a la literatura puede influir en la interacción con ciertos componentes de la estructura celular y también la propiedad de superparamagnetismo se ve afectada ya que dicha característica sólo es observable en nanopartículas <20 nm, por lo que las muestras obtenidas solo cuentan con ferrimagnetismo, explicando de cierta forma el comportamiento biológico que se detallará líneas más adelante.

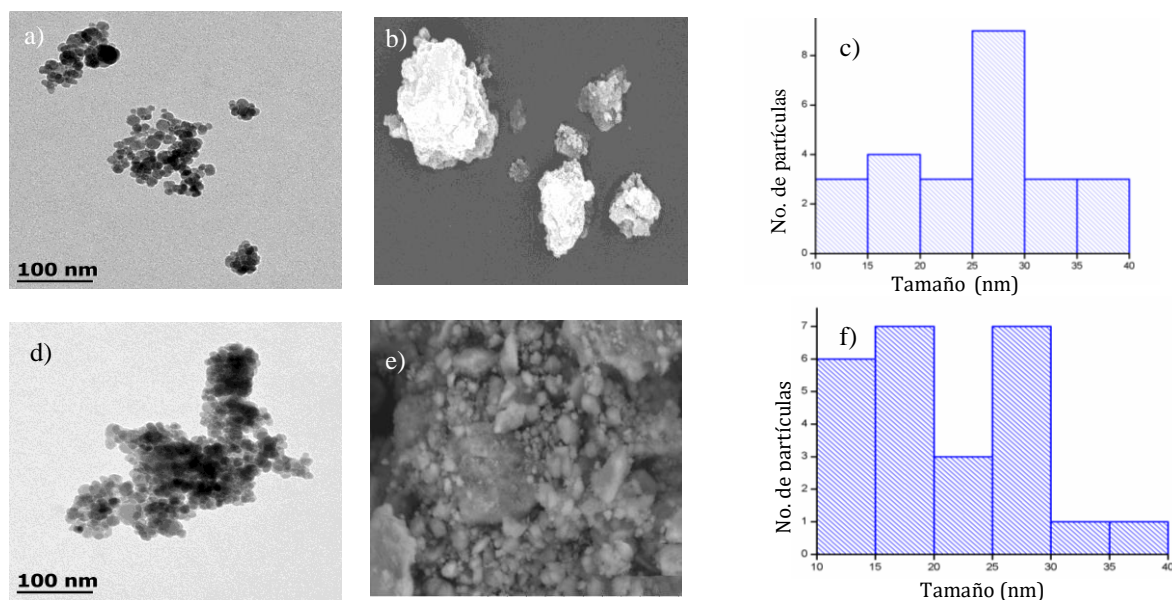


Figura 8. a) Microfotografía TEM de NPs con quitosán, b) Microfotografía SEM del recubrimiento superficial de las NPs, c) Tamaño promedio de NPs tras la adición del quitosán, d, e y f) Microfotografía TEM, SEM y gráfico correspondiente a las NPs sin adición de quitosán. **Fuente:** Directa.

Difracción de rayos X (DRX) y Espectrometría infrarroja (FTIR)

Como puede apreciarse en las gráficas de la figura 9a al obtener el patrón de difracción tanto del quitosán desacetilado solo, las nanopartículas sin y con recubrimiento se puede expresar lo siguiente: los picos característicos de la magnetita a 30° (220), 35° (311), 43° (400), 57° (511) y 62° (440) pueden observarse en ambos grupos de nanopartículas por lo que puede manifestarse que el recubrimiento no afecta de forma notoria la estructura cristalina del material pero sí puede observarse su presencia en el rango comprendido entre los 10° y 22° , característico de este tipo de material dada su estructura amorfa. Evidentemente algunos picos muestran mayor intensidad en uno u otro grupo, sin embargo, dicho comportamiento es algo esperado y reportado previamente por diversos autores. (10-23, 40-45)

Respecto a lo observado en el espectro infrarrojo (figura 9b) es importante señalar que las bandas más importantes que confirman la presencia de quitosán en la superficie de las nanopartículas son las correspondientes a 585 cm^{-1} , que es indicativo de la presencia de aminas primarias (componentes de la estructura química del quitosán) y la banda en 1406 cm^{-1} , es también una vibración asignada a la presencia de grupos OH; el análisis del quitosán mediante FTIR hubiese aportado información valiosa, sin embargo dadas dificultades técnicas se optó por realizar dicha caracterización únicamente para los grupos de NPs. Estudios como el de Nehra et al, muestran similitud a los resultados obtenidos en este estudio, algunos otros muestran espectros distintos, lo que está en función del tipo de quitosán empleado para el recubrimiento, especialmente del grado de desacetilación.⁽³⁵⁾

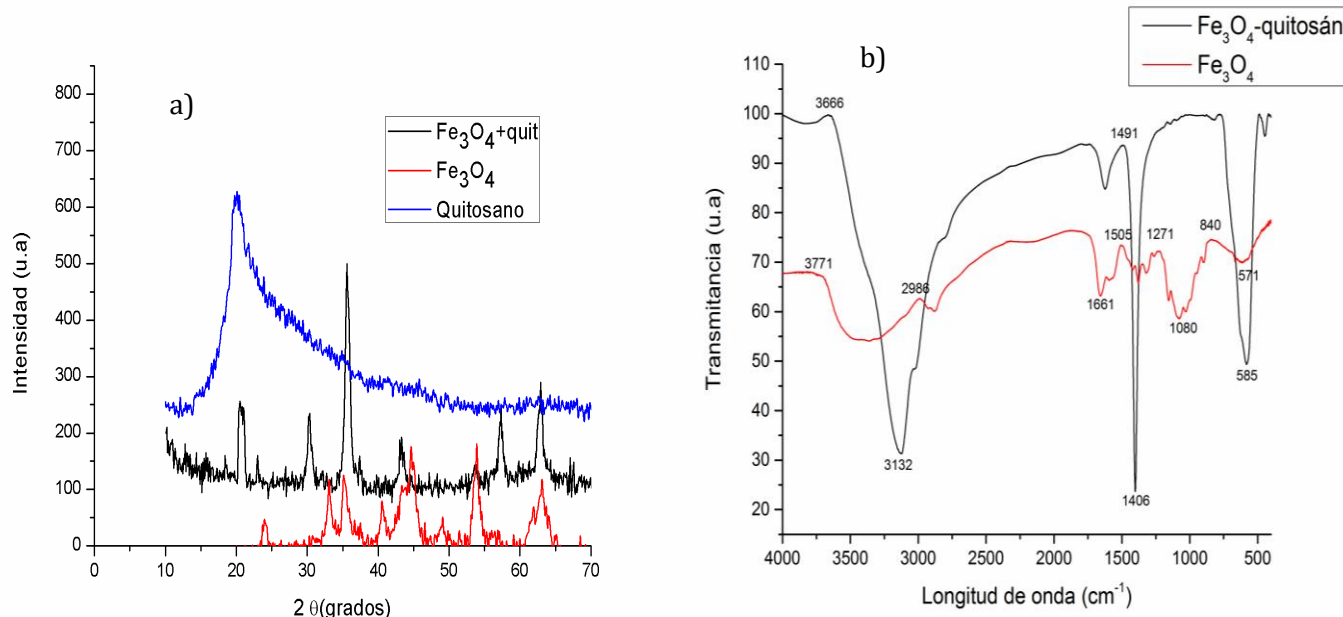


Figura 9. a) Patrón de difracción en DRX del quitosán, NPs sin recubrimiento y NPs con recubrimiento, nótese los picos característicos de la magnetita. b) FTIR de ambos grupos de NPs, las bandas observadas correspondientes a los grupos funcionales del quitosán confirman la presencia del material en la superficie. **Fuente:** Directa.

Magnetometría de muestra vibrante (VSM) y espectroscopía UV-vis

Como puede apreciarse en la figura 10a, el mayor pico de absorción en el espectro UV-vis se observó a 220 nm, esto es indicativo y característico del quitosán y en general de los polisacáridos naturales, sin embargo, al no mostrar otro pico se considera que al menos para este estudio el quitosán interfirió en la caracterización por esta técnica.

Por otra parte, al observar el comportamiento magnético a temperatura ambiente se observa que el material alcanzó al menos 60 emu/g (figura 10b), lo cual es muy bueno para aplicaciones biológicas (especialmente para hipertermia) y muestra que el quitosán no afecta de forma considerable esta propiedad al ser comparado con estudios previos de la evaluación de estas nanopartículas sin la adición de dicho material. En cuanto al fenómeno de histéresis del material se pudo observar que es baja, lo cual está en concordancia con el tamaño de la partícula, ya que dicha propiedad se presenta en mayor medida en partículas <20 nm. (10-18, 31-33)

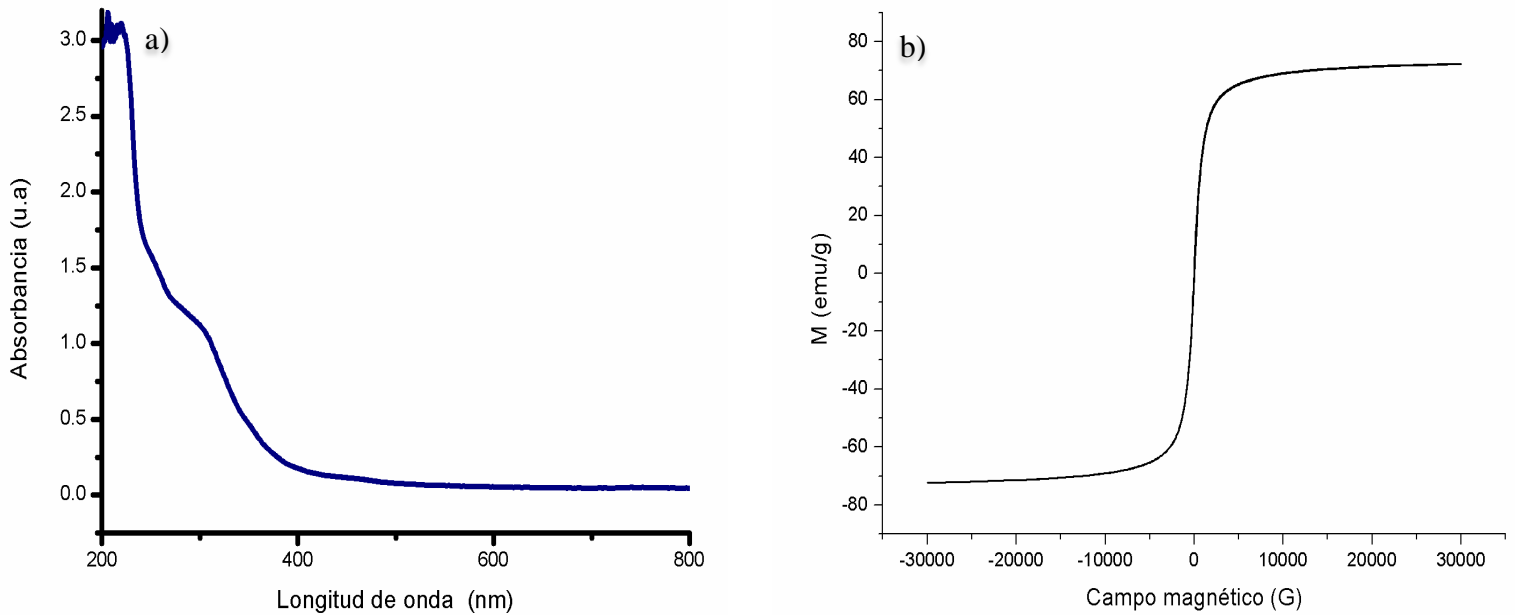


Figura 10. Ambos gráficos corresponden al grupo de NPs con quitosán. a) Espectro UV-vis en donde se observa el pico máximo característico del quitosán. b) Gráfico de la prueba VMS, el potencial de magnetización alcanzado es adecuado para aplicaciones biológicas como la hipertermia. **Fuente:** Directa.

Citotoxicidad

Los experimentos realizados en los 3 grupos celulares mostraron distintos grados de viabilidad celular, con un comportamiento dosis-dependiente, sin embargo, para ambos grupos se observó que la citotoxicidad en las células fue $HPC < HPLF < HGF$, entre ambos grupos de partículas de acuerdo con lo esperado y lo reportado el grupo con recubrimiento de quitosán mostró mejores resultados en este sentido. Incluso en las líneas celulares HPC y HGF se observó un efecto de hormesis para el grupo con quitosán (proliferación a dosis bajas y reducción de la viabilidad a dosis altas). La figura 11 muestra las gráficas en donde se observa el comportamiento en las 3 líneas celulares en contacto con ambos grupos durante 24 horas. Respecto al análisis estadístico las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se observaron entre las dosis más bajas de ambos grupos y entre las dosis más bajas y las más altas. En el análisis intragrupos el comportamiento fue similar ya que las dosis más bajas de las NPs con quitosán para el caso de HPC y HPLF mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control y con respecto a las dosis más altas.

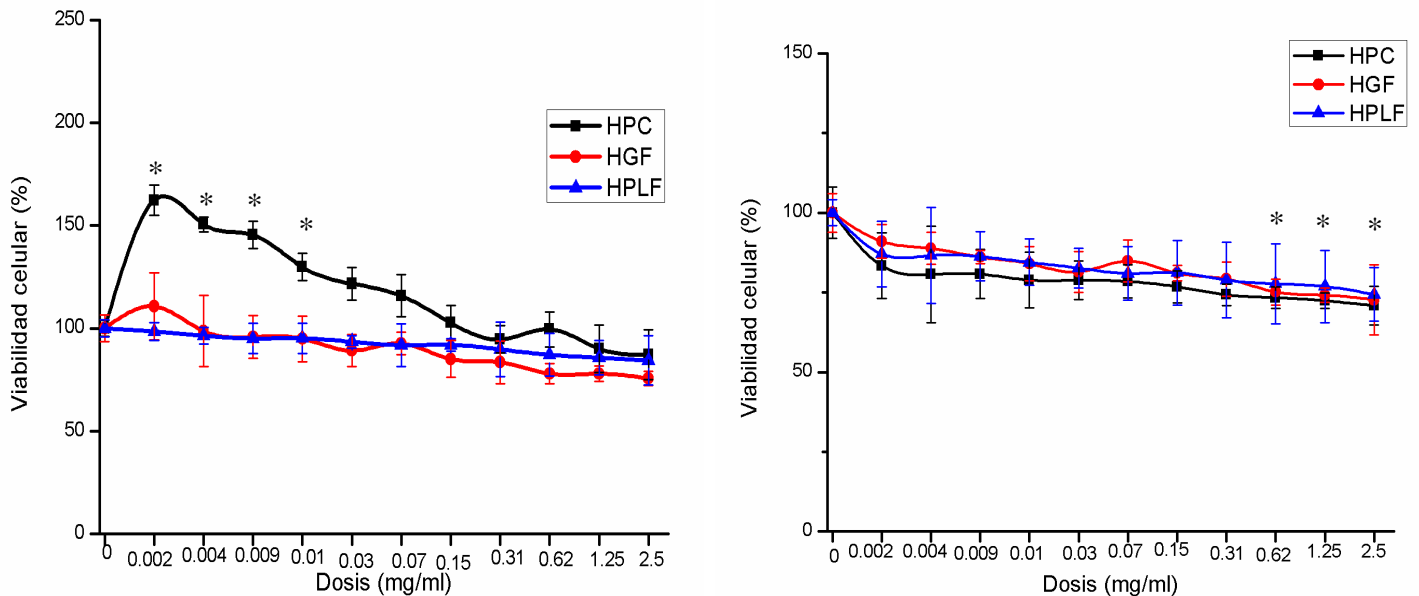


Figura 11. Viabilidad celular de 3 líneas celulares orales a diferentes dosis de 2 grupos de NPs. Los datos representados en porcentajes y desviación estándar son resultado de 3 experimentos independientes por triplicado. Valor p fijado < 0.05 . **Fuente:** Directa.

La CC_{50} en los grupos experimentales fue > 2.5 mg/ mL, dosis que se apega a los resultados evidenciados en diversos artículos en donde incluso se mencionan dosis máximas de 5 mg/ mL como CC_{50} ⁽⁴⁶⁻⁵¹⁾. Respecto a los datos obtenidos en el presente estudio se puede plantear que el recubrimiento favorece la interacción célula-nanopartícula disminuyendo los efectos adversos sobre la proliferación celular. Las figuras 12,13 y 14 muestran microfotografías representativas de los ensayos de MTT realizados en HPC, HGF y HPLF en ese orden de aparición respectivamente. Se observan los grupos controles y dos dosis experimentales una dosis baja y la dosis más alta, en las 3 líneas celulares se pueden identificar comportamientos similares, en dosis bajas hay mayor proliferación y a dosis altas hay una reducción de esta. Otro aspecto interesante es que según lo observado para el grupo de NPs con quitosán no hay cambios morfológicos aparentes importantes, en cambio en las células en contacto con las NPs sin quitosán pueden apreciarse ligeros cambios de morfología y de tamaño. Todas las fotografías fueron tomadas con el aumento 20X.

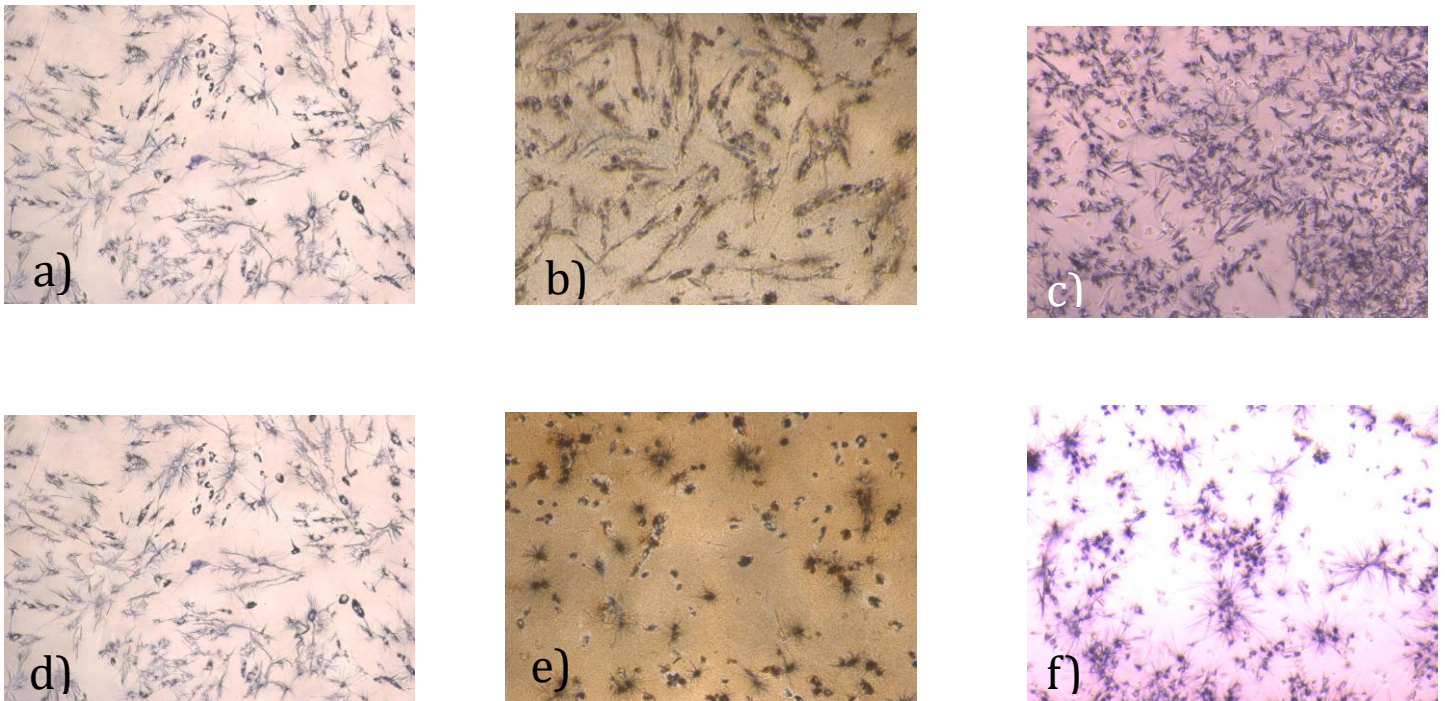


Figura 12. HPC a y d) grupos controles, b y c) NPs con quitosán, dosis más baja y dosis más alta respectivamente, e y f) contraparte de b y c de NPs sin quitosán.

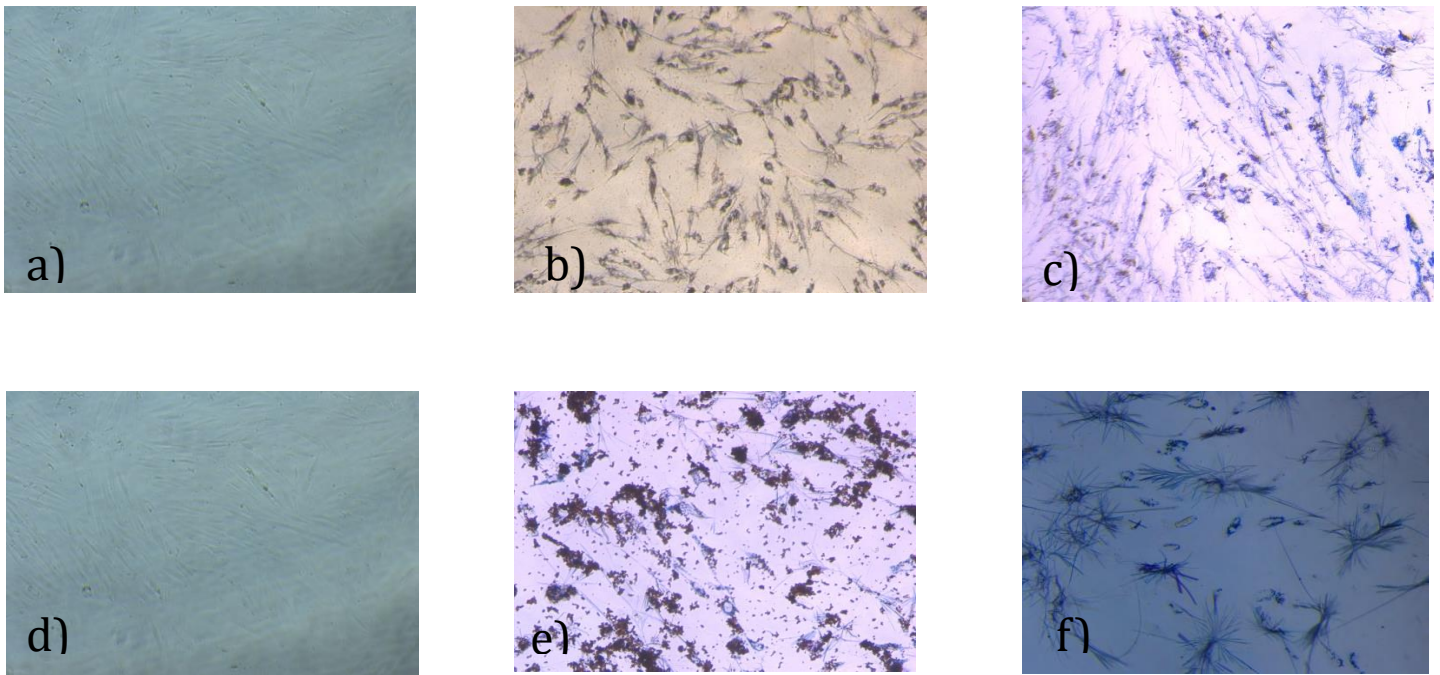


Figura 13. HGF a y d) grupos controles, b y c) NPs con quitosán, dosis más baja y dosis más alta respectivamente, e y f) contraparte de b y c de NPs sin quitosán.

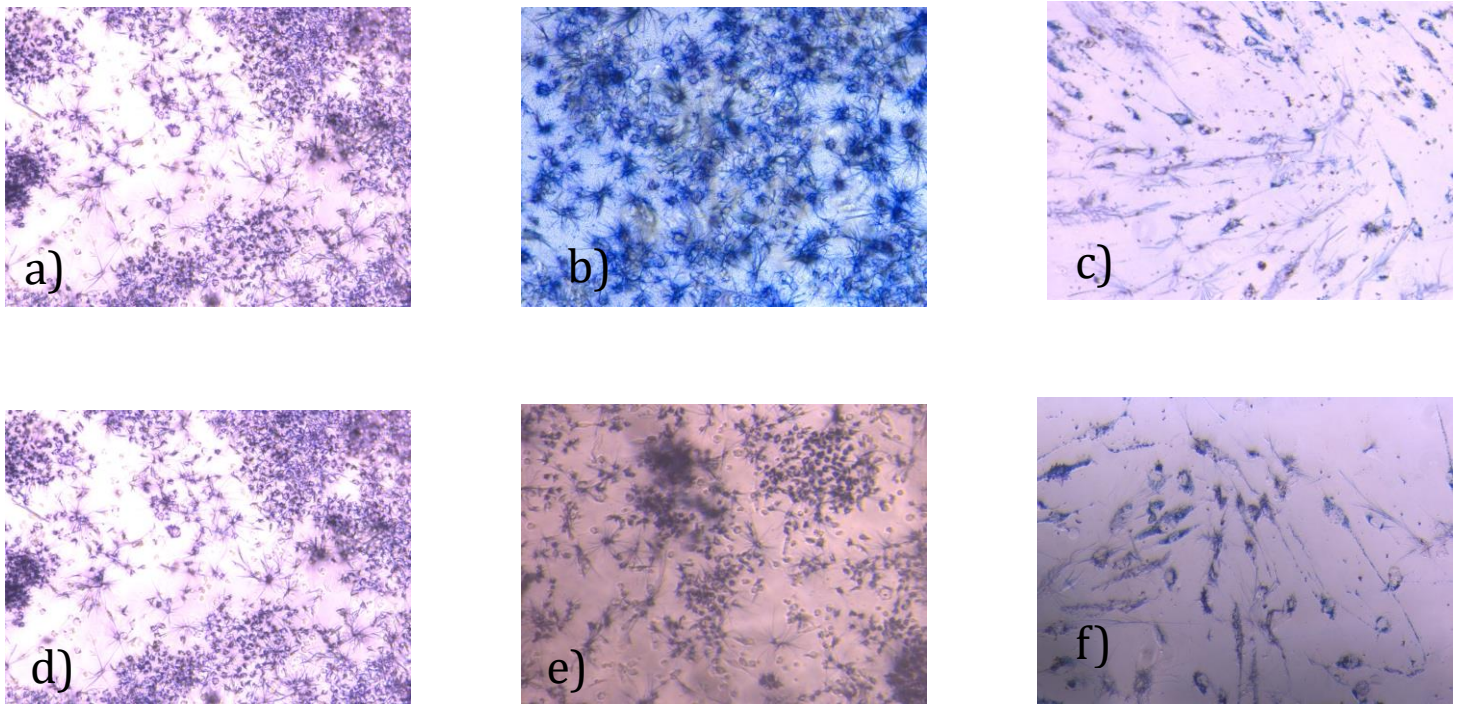


Figura 14. HPLF a y d) grupos controles, b y c) NPs con quitosán, dosis más baja y dosis más alta respectivamente, e y f) contraparte de b y c de NPs sin quitosán.

Ensayo ELISA

La producción de prostaglandina en las 3 líneas celulares puede observarse en la figura 15. En las 3 líneas se puede corroborar que el grupo de NPs en presencia de una citocina proinflamatoria como la interleucina 1 β incrementa la producción de prostaglandina, dicho comportamiento es similar a lo reportado previamente por García-Contreras et. al. en la evaluación de NPs de TiO₂.⁽⁵⁻¹⁰⁾ Esta característica es muy importante porque en el potencial uso que puedan tener a futuro para aplicaciones clínicas debe de evitarse el uso en condiciones donde existan procesos inflamatorios previos ya que dicha condición se podría exacerbar. Algo interesante a puntualizar es que la adición de el quitosán redujo de forma significativa la producción de prostaglandina comparada con el grupo sin adición de este, sin embargo, en ninguna de las 3 líneas celulares el efecto puede considerarse como antiinflamatorio como se postulaba en un principio, ya que al comparar este grupo con los grupos sin la adición de la 1 β se observa que la producción de prostaglandina sigue siendo mayor.

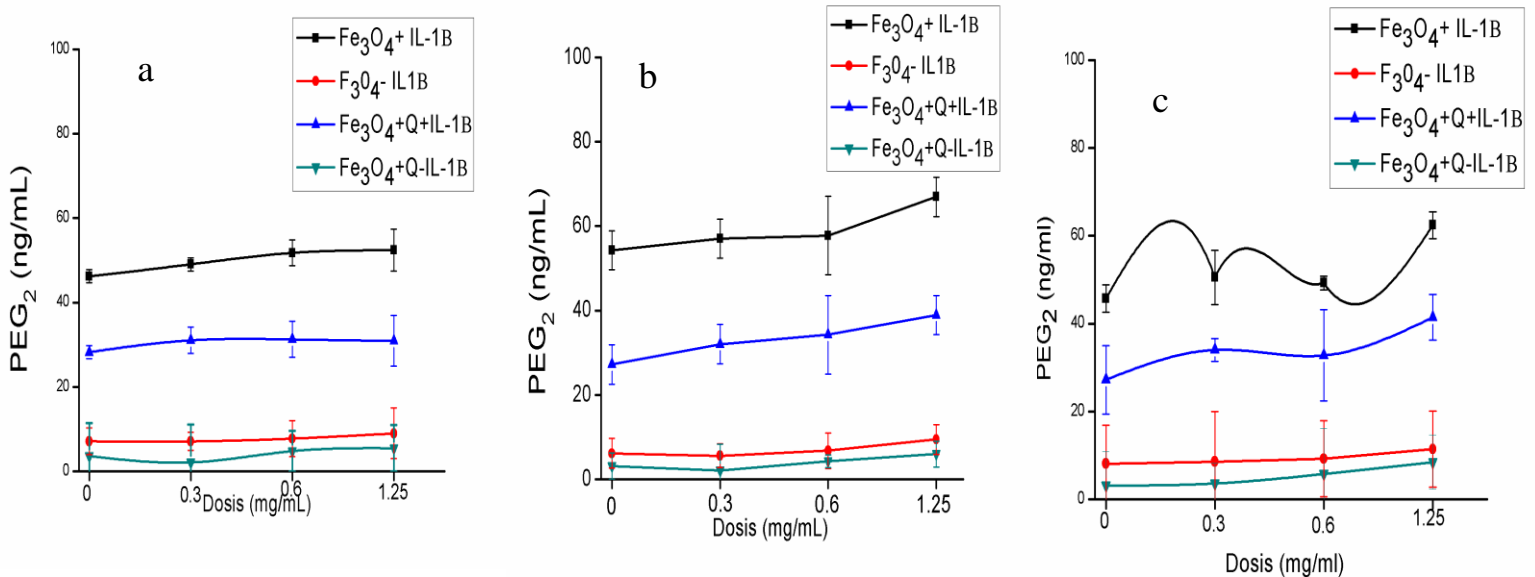


Figura 15. Producción de PGE₂ en las 3 líneas celulares a) HPC, b) HGF y c) HPLF. Nótese que en la gráfica c existe una variación considerable para el grupo de Fe₃O₄ + IL-1 β , atribuible a probables errores durante la ejecución de la técnica.

Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Un aspecto importante de la evaluación biológica de este tipo de materiales es la producción de ROS, ya que al tener como componentes iones de hierro es conocido que pueden producirse grupos hidroxilo ^(52,53), la producción en las líneas celulares estudiadas sin contacto con ninguna muestra es HPC<HGF<HPLF, para el grupo de NPs sin quitosán la producción fue HPC<HGF<HPLF, para el grupo de NPs sin quitosán pero con H₂O₂ el comportamiento fue el siguiente: HPLF<HGF<HPC, para el grupo de NPs+quitosán la producción fue HPC<HFF<HPLF, finalmente en el caso de del grupo de NPs+quitosán+ H₂O₂ la producción observada fue HPC<HGF y HPLF, teniendo estas dos últimas líneas valores similares. Se observaron diferencias estadísticas entre los grupos de de NPs con y sin adición de H₂O₂ en HPC y HPLF. Diversos estudios mencionan que las células tienen distintos mecanismos de acción para mantener la homeostasis ante la producción de estas especies y que en situaciones donde los niveles sean muy elevados y mantenidos de forma crónica las células pierden su capacidad de transformar estas moléculas a agua y oxígeno y es cuando se produce el daño celular a través del daño de distintas biomoléculas incluida la probable activación de la vía apoptótica denominada ferroptosis.^(54,55) La importancia de conocer los efectos del contacto directo de estas NPs en la producción de ROS, radica en que los componentes dada su naturaleza intrínseca pueden ser altamente oxidables, sin embargo este fenómeno puede disminuirse con la adición de recubrimientos superficiales que protejan y mantengan su estabilidad por más tiempo. El presente estudio sugiere que las NPs protegidas por el quitosán disminuye considerablemente la producción, lo cual resulta primordial ya que podrían ser utilizadas por más tiempo y con mayor seguridad y eficiencia, sin embargo unas de las mayores limitantes en esta parte del estudio es que solo se utilizó una dosis única para todos los grupos y hace falta realizar esta evaluación a tiempos de exposición más prolongados para determinar su comportamiento a través del tiempo y corroborar el impacto de la producción de ROS con la viabilidad celular para observar si existe una relación directa entre la cantidad de dichas moléculas producidas por este material y la proliferación/muerte celular. La figura 16 muestra el comportamiento observado para ambos grupos de NPs en todas las líneas celulares.

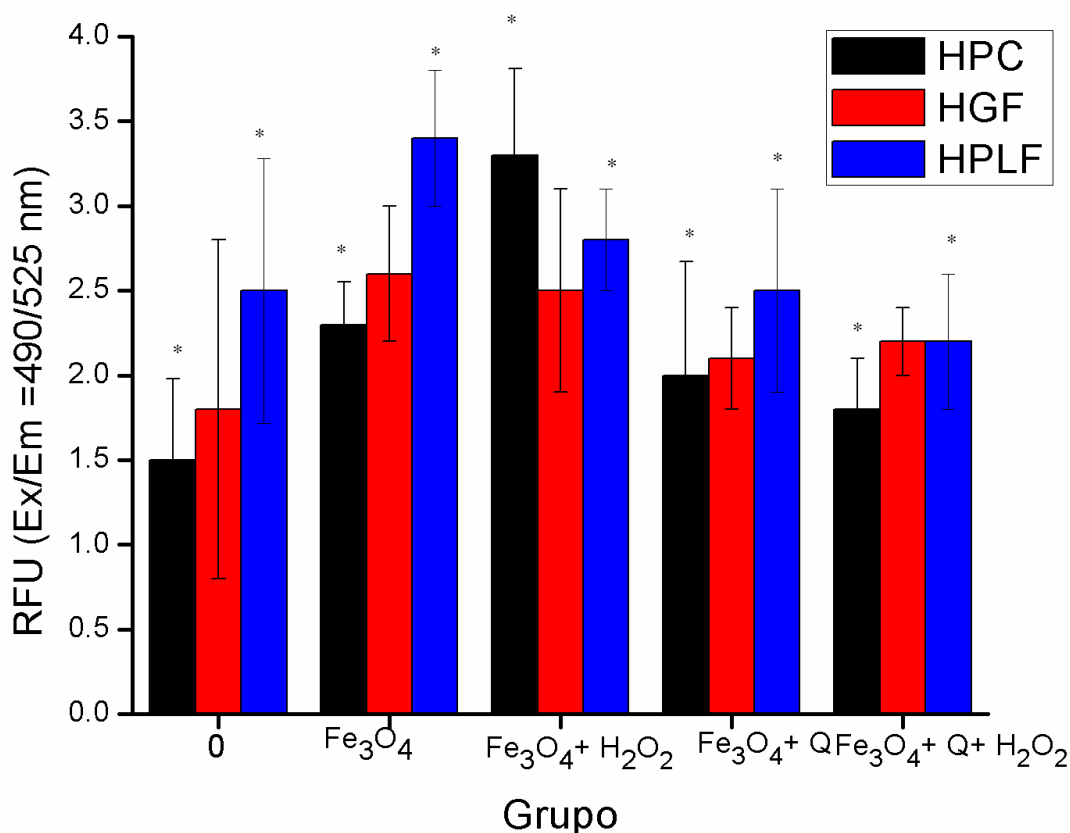


Figura 16. Producción de ROS en HPC, HGF y HPLF con y sin estimulación por adición de H₂O₂, es importante notar que las NPs con quitosán reducen la producción de ROS.

Internalización celular para muestras de Fe₃O₄-quitosán

En la figura 17 se pueden apreciar las microfotografías obtenidas por TEM a dos dosis diferentes en las 3 líneas celulares, se observa que en su mayoría se encuentran distribuidas en los alrededores de la membrana plasmática, sin embargo, es claro que las concentraciones elevadas hacen que la aglomeración impida la penetración de todas las NPs y solo se observan relativamente pocas al interior de esta. Ha sido ampliamente estudiado y evidenciado que el tamaño de las NPs juega un papel fundamental en la captación intracelular y que puede llevarse a cabo mediante procesos como la pino y endocitosis. Algunas NPs como las de TiO₂ han sido estudiadas y se ha observado una mayor captación intracelular, fenómeno atribuible al tamaño y forma, existen reportes de NPs suficientemente pequeñas para atravesar la membrana plasmática y llegar hasta el

núcleo, de ahí que nuevas tendencias tecnológicas utilicen dichas NPs para aplicaciones en biología molecular y genética principalmente. (5-10, 56-60)

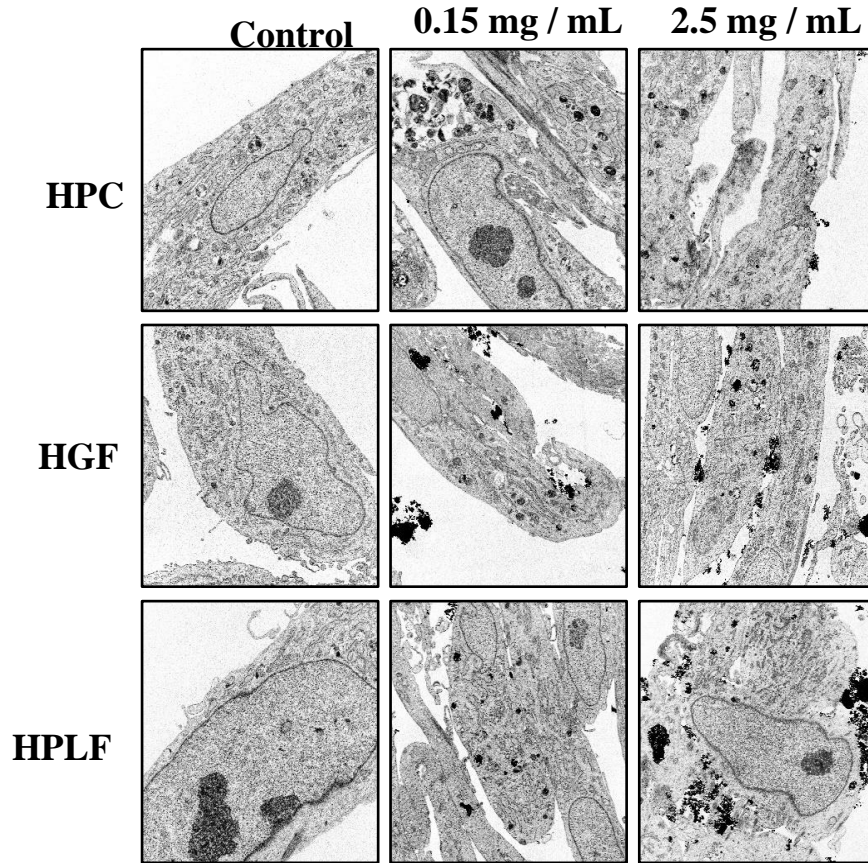


Figura 17. Cortes de las 3 líneas celulares en contacto con dos dosis de NPs con quitosán, la aglomeración provoca cúmulos en la periferia de la membrana celular y pocas logran la internalización.

Expresión de COX-1 y COX-2

La expresión de Cox-1 en células pulpares a 1.25 mg/mL se observa en la figura 18a y Cox-2 en la figura 18b, las figuras 19a y 19b corresponden a la expresión de Cox-1 y Cox-2 en HGF, respectivamente. Es importante conocer este nivel de expresión proteica porque se pueden establecer relaciones con la producción de PGE₂ de los ensayos previos (ELISA) y con los resultados de otros estudios, especialmente y de particular interés en odontología con NPs de TiO₂.⁽⁶⁻¹⁰⁾ Una observación importante es confirmar que tanto en HPC y HGF, Cox-1 muestra mayores niveles de expresión con relación a Cox-2 en la muestra control (células sin ningún tipo de tratamiento) lo cual está en concordancia a lo expresado en diversos artículos que mencionan que de forma constitutiva estos valores son mayores para Cox-1.⁽²⁵⁻³⁰⁾ Al realizar la comparativa entre los dos grupos de NPs para ambas líneas celulares observamos un patrón que se repitió en los otros ensayos de este trabajo, ya que el grupo de NPs con inducción de inflamación mostró una mayor expresión que las muestras donde no se utilizó la IL- β como inductor proinflamatorio y la expresión para el grupo de NPs con quitosán fue menor; aunque dicha observación es más evidente en HGF que en HPC, lo cual es algo que dentro de los múltiples factores que podrían dar respuesta a dicho comportamiento y sin ser la única explicación podría sugerirse con base en lo revisado en la literatura que el tiempo de vida media de Cox-2 es significativamente menor comparado con Cox-1, máxime en condiciones normales comparado con tejidos inflamados, donde evidentemente la producción y cantidad es mayor. Otra de las causas por las que el patrón de expresión se visualiza de mejor forma en HGF es que las provenientes de la pulpa dental presentan una heterogeneidad mayor. Diversos autores han señalado la importancia de ambas proteínas en la producción de PGE₂ y se ha señalado que Cox-2 es la que guarda una relación más directa con esta producción ya que Cox-1 si bien participa en los procesos inflamatorios, su espectro de acciones fisiológicas en condiciones normales es más ampliamente reconocido, por lo que su expresión no necesariamente tiene que ver con procesos inflamatorios, lo cual puede constatarse en los ensayos realizados en este trabajo.⁽²⁵⁻³⁵⁾ La importancia clínica directa de utilizar la IL- β radica en el hecho de que esta se ha encontrado en líquido crevicular en condiciones de gingivitis, activando una respuesta reactiva de los fibroblastos lo que desencadena una producción de

ciclooxigenasas y una subsecuente pérdida de tejido en caso de mantener el estímulo, por lo que en caso de utilizar estas NPs lo adecuado sería la remoción en un tiempo relativamente corto o bien en conjunto con algún fármaco inhibidor de Cox-2, por lo que sería interesante evaluar el efecto del empleo de ambos componentes en modelos celulares y animales, particularmente en el empleo de antiinflamatorios no esteroideos ya que es conocido que la inhibición de Cox-2, disminuye la progresión de resorción ósea en pacientes con periodontitis. Otro punto relevante para considerar en futuras investigaciones, especialmente en HPC, sería la relación entre el factor de crecimiento del endotelio vascular y la expresión de Cox-2 ya que al establecer la relación entre la angiogénesis y la inflamación el uso de las NPs para el caso de patologías pulpares quedaría limitado considerablemente y con mayor potencial en aplicaciones regenerativas. Otra limitante importante a señalar es el hecho de no haber realizado dicha prueba en HPLF y a más dosis, asimismo si bien se utilizaron células inducidas por interleucina como control positivo y células sin tratamiento como control negativo, un tercer control debió ser alguna proteína constitutiva como la β -actina, referida por diversos autores, lo cual sin lugar a dudas otorgaría una mayor validez interna al ensayo, sin embargo por razones presupuestales y de tiempo, en este trabajo no se muestran dichos experimentos.

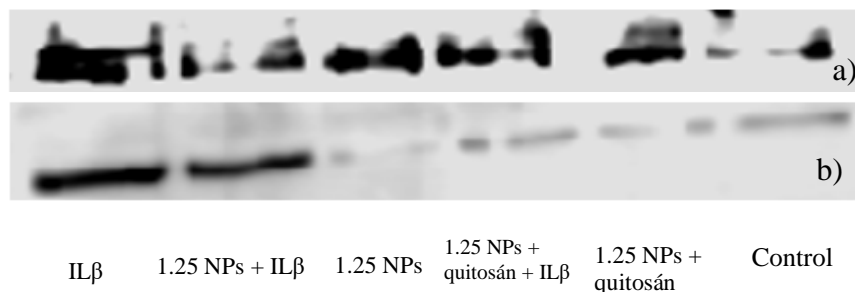


Figura 18. a) Imagen representativa de la expresión de Cox-1 y b) Cox-2 mediante western blot en HPC a 1.25 mg/mL con y sin IL- β .

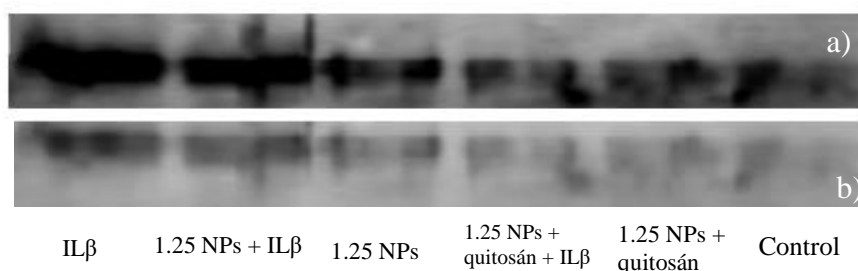
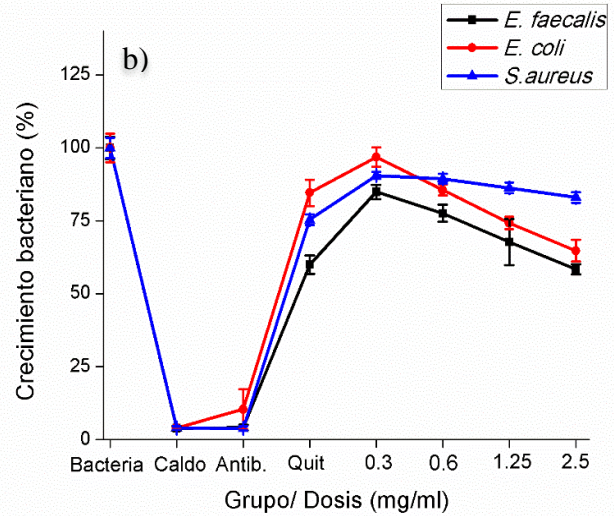
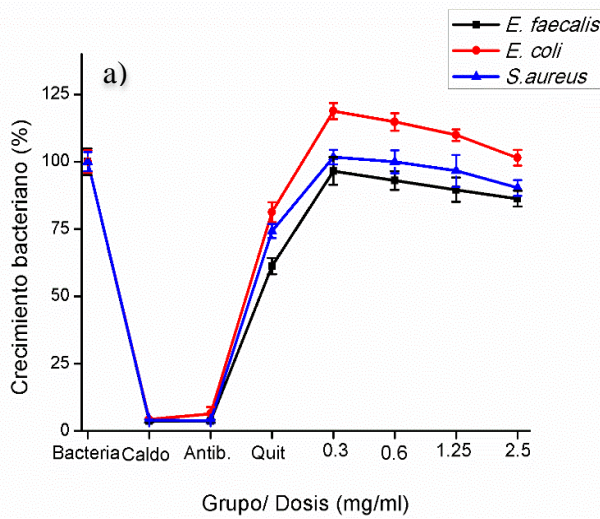


Figura 19. a) Imagen representativa de la expresión de Cox-1 y b) Cox-2 mediante western blot en HGF a 1.25 mg/mL con y sin IL- β .

Actividad antimicrobiana

Las diferentes dosis evaluadas para ambos grupos no mostraron efectos bactericidas y bacteriostáticos importantes de forma estadísticamente significativa comparados con los grupos controles, si bien el grupo que contiene quitosán mostró ligeramente mayores efectos sobre las bacterias, especialmente para *E. faecalis*, puede observarse como inclusive el quitosán utilizado de forma independiente mostró mejores efectos sobre las 3 bacterias utilizadas, lo cual también puede atribuirse a que al combinarse con las NPs algunas de las propiedades del quitosán puedan verse modificadas. Aunque teóricamente se esperaban efectos positivos para inhibir la acción bacteriana principalmente por la producción de ROS/reacciones tipo Fenton y ruptura directa de la membrana al interaccionar con las cargas de las NPs, vemos que dicho efecto no fue el deseado, lo cual también puede encontrarse reportado en diferentes estudios, ya que aún existen grandes discrepancias entre el efecto antimicrobiano real de estas NPs, ya que mientras unos autores postulan que su efecto es muy bueno otros afirman que el efecto es nulo y que incluso pueden llegar a disminuir los efectos de antibióticos cuando se utilizan de forma conjunta.

Existen reportes que indican efectos sobre *E. coli* y *S. aureus* a dosis a partir de 3 mg/mL, lo que se sugiere para futuras investigaciones es emplear campos magnéticos externos para provocar el movimiento y calentamiento de las NPs y observar los efectos sobre el crecimiento bacteriano ya que es precisamente el uso de estos dispositivos la forma en que se ha demostrado un efecto en la reducción de biofilms. (20-36) La figura 20 muestra el comportamiento observado en los ensayos.



Análisis del ciclo celular

Como puede observarse en las figuras 21 y 22, correspondientes al análisis del ciclo celular en HGF, la dosis empleada de NPs (1.25 mg/mL) al ser comparada con los controles positivo y negativo y utilizando la fase sub-G1 como marcador de apoptosis, muestra que en los 3 grupos tienen la mayoría de las células en la fase G1 como era de esperarse, sin embargo en la literatura reciente también se ha mencionado la importancia de considerar que en ocasiones incluso células que aparecen en el pico límite entre las fases sub-G1 y G1 podrían en realidad tratarse de células en fases iniciales de apoptosis, esto es especialmente importante en el caso del grupo de NPs y el control positivo de actinomicina, en donde el destino final se corrobora en las células que se encuentran en la fase G2/M en donde se observa que el número de células que se encuentran en esta fase para el caso de las NPs es mayor sugiriendo que no existe inducción de apoptosis, lo cual puede relacionarse directamente con los ensayos de citotoxicidad realizados en este estudio en donde se observa que tienen un comportamiento altamente biocompatible, en concordancia con lo reportado en la literatura,^(15-22, 65-70) es por demás interesante pero a la vez una limitante del presente estudio no haber realizado dicho experimento para el grupo de NPs sin quitosán para corroborar los hallazgos encontrados en el ensayo de citotoxicidad para dicho grupo, lo cual sin lugar a dudas habría otorgado mayor validez interna a nuestro ensayo, sin embargo, al no tratarse del objetivo principal de este trabajo se sugiere realizar este experimento en futuras investigaciones que contemplen el empleo de esta técnica, asimismo, se recomienda considerar más dosis, distintos tiempos de exposición y complementarlo con las otras líneas celulares. Por último, es importante mencionar que las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas.

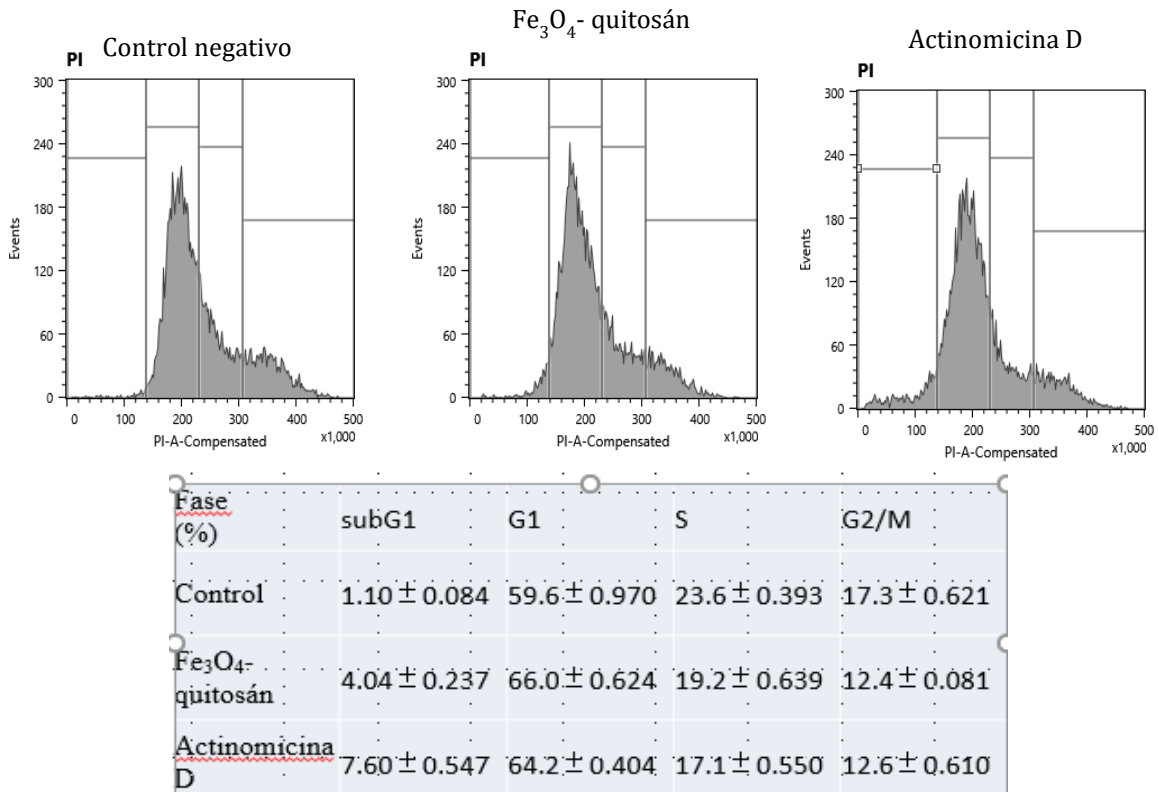


Figura 21. Histograma y porcentajes de material genético de HGF en las distintas fases del ciclo celular determinadas por citometría de flujo y tinción con yoduro de propidio. **Fuente:** Directa.

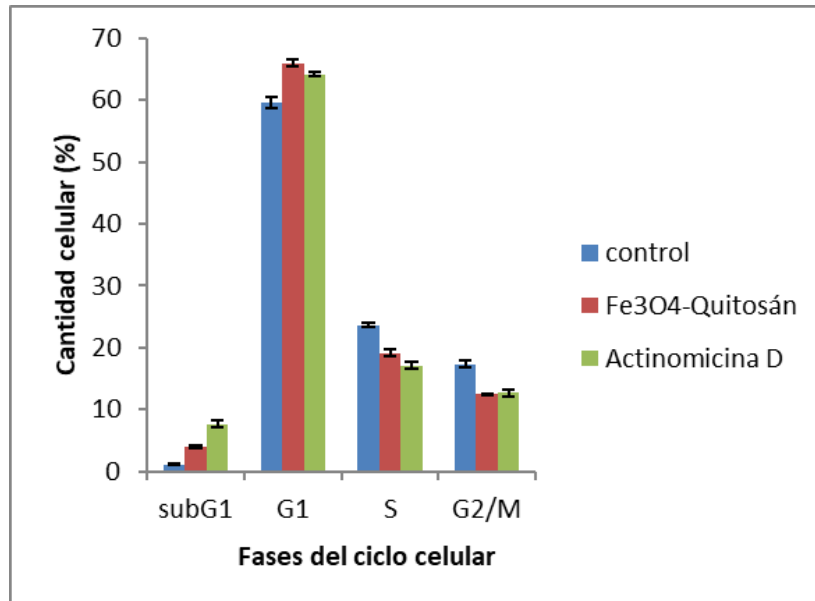


Figura 22. Representación gráfica auxiliar para la identificación de las fases celulares en los 3 grupos analizados, nótese la mayor inducción de apoptosis por actinomicina D contrastada con las NPs de Fe₃O₄-quitosán. **Fuente:** Directa.

17 Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos la hipótesis planteada en un inicio se acepta de forma parcial, ya que se observó una adecuada citocompatibilidad de ambos grupos de NPs pero con escasa o nula actividad antimicrobiana. Si bien el quitosán influyó de forma positiva en la interacción con las células y en la disminución de efectos como producción de PGE₂, ciclooxigenasas y ROS hacen falta más investigaciones complementarias que consideren otras variables como tiempo, distintos ambientes y/o modelos, interacciones con otros agentes y materiales, lo anterior, con la finalidad de apegarse a los protocolos regulatorios internacionales de este tipo de tecnologías que se vislumbran en los próximos años.

En apego a los resultados obtenidos en el presente estudio, dentro de las perspectivas futuras en el campo de los nanomateriales diseñados como posibles alternativas en la odontología y demás áreas biomédicas se deben contemplar siempre los probables efectos y fenómenos celulares y moleculares de su empleo, conjuntando dicha información obtenida en las áreas básicas para fortalecer el binomio ciencia-clínica y generar mejores opciones terapéuticas en el ámbito odontológico a través de la difusión y práctica de la medicina traslacional.

18 Referencias

1. Mohammed L., Hassan G., Goma A., Ragab D., & Zhu J. (2017). Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*,30,1–14.
2. Dias A., Hussain A. & Roque A. (2011). A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29, 142–155.
3. Wang Q., Chen B., Ma F. & Lin S. (2017). Magnetic iron oxide nanoparticles accelerate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via modulation of long noncoding RNA INZEB2. *Nano Research*, 10(2): 626–642.
4. Shukula S. & Jadaun A. (2015) In vitro toxicity assessment of chitosan oligosaccharide coated iron oxide nanoparticles. *Toxicology Reports*,35, 69-73.
5. Salehizadeh H., Hekmatian H., Sadeghi M. & Kennedy K. (2012). Synthesis and characterization of core-shell Fe₃O₄-gold-chitosan nanostructure, *Journal of Nanobiotechnology*, 10:3.
6. Garcia-Contreras R., Scougall-Vilchis RJ., Contreras-Bulnes R., Ando Y., Kanda Y., Hibino Y., *et al.* (2014). Induction of prostaglandin E2 production by TiO₂ nanoparticles in human gingival fibroblast. *In vivo*, 28, 217-222.
7. Garcia-Contreras R., Sugimoto M., Umemura N., Akita S., Kaneko M., Hatakeyama Y., *et al.* (2015). Alteration of metabolomic profiles by titanium dioxide nanoparticles in human gingivitis model. *Biomaterials*, 57, 33-40.
8. Gholoobi A., Meshkat Z., Abnous K., (2017). Biopolymer-mediated synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and investigation of their in vitro cytotoxicity effects. *Journal of Molecular Structure*,41, 594-599
9. Garcia-Contreras R., Sakagami H., Nakajima H. & Shimada J. (2010). Type of cell death induced by various metal cations in cultured human gingival fibroblasts. *In Vivo*, 24,513-518.
10. Garcia-Contreras R., Scougall-Vilchis RJ., Contreras-Bulnes R., Ando Y., *et al.* (2014). Effects of TiO₂ nanoparticles on cytotoxic action of chemotherapeutic drugs against a human oral squamous cell carcinoma cell line. *In vivo*, 28, 209-216.
11. Yu K., Tun Y., Zhongwei Z., Mingyuan L. & Yuan Y. (2012). Application of Ferriferous Oxide Modified by Chitosan in Gene Delivery. *Journal of Drug Delivery*, 15, 23-30.
12. Dhivyaa M., Sathiyaa S., Manivannanb G. & Rajan J. (2016). A Comparative Study on the Biopolymer Functionalized Iron Oxide Nanocomposite for Antimicrobial Activity. *Materials Today: Proceedings*, 3, 3866–3871.
13. Niemirowicz K., Durnas B. & Tokajuk G. (2016). Magnetic nanoparticles as a drug delivery system that enhance fungicidal activity of polyene antibiotics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*,12, 2395–2404.
14. Lee J., Jung J., Choi J. & Kwon T. (2013). Enhanced bone morphogenic protein adenoviral gene delivery to bone marrow stromal cells using magnetic nanoparticle. *Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*,39,112-119.
15. Mc Bain S. & Yiu H. (2008). Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery, *International journal of nanomedicine*, 3, 169-180.

16. Moreno A., Gomez T., Nuñez R., Acosta L. & Castañón V. (2012). Polymeric and Ceramic Nanoparticles in Biomedical Applications. *Journal of Nanotechnology*, 4, 25-33.
17. Garcia-Contreras R., Argueta L., Mejía C., Jiménez R., Cuevas S., Sánchez P., *et al.* (2011). Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *International Dental Journal*, 61, 297–301.
18. Saxena N. & Man Singh. (2017). Efficient synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles under air for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 429, 166–176.
19. Coricovac D., Moaca E. & Pinzaru L. (2017). Biocompatible colloidal suspensions based on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis. Characterization and toxicological profile. *Frontiers in pharmacology*, 10, 320-327.
20. Yun H., Lee E., Kim M., Kim J., Lee J. & Lee H. (2015). Magnetic Nanocomposite Scaffold-Induced Stimulation of Migration and Odontogenesis of Human Dental Pulp Cells through Integrin Signaling Pathways. *PLoS ONE*, 10, 14-20.
21. Yun H., Ahn S., Kim M. & Kim J. (2016). Magnetic nanocomposite scaffolds combined with static magnetic field in the stimulation of osteoblastic differentiation and bone formation. *Biomaterials*, 30, 25-34.
22. Wang Q., Chen B., Cao M., Sun J. & Wu H. (2016). Response of MAPK pathway to iron oxide nanoparticles in vitro treatment promotes osteogenic differentiation of hBMSCs. *Biomaterials*, 86, 11-20.
23. Yun H., Lee J., Kim M., Jung-Ju Kim., Jung-Hwan Lee. & Hae- Hyoung Lee. (2015). Magnetic Nanocomposite Scaffold-Induced Stimulation of Migration and Odontogenesis of Human Dental Pulp Cells through Integrin Signaling Pathways. *PLoS ONE*, 10, 138-145.
24. Pati S., Singh H. & Guimaraes E. (2016). Magnetic chitosan-functionalized Fe₃O₄-Au nanoparticles: Synthesis and characterization. *Journal of Alloys and Compounds*, 684, 68-74.
25. Soares P., Machado D. & Laiab C. (2016). Thermal and magnetic properties of chitosan-iron oxide nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 149, 382–390.
26. Perez L., Cesteros L. & Katime I. (2013). Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*, 94, 836– 842.
27. Acosta L., López L., Núñez R., Hernández G. & Castañón V. (2011). Biocompatible Metal-Oxide Nanoparticles: Nanotechnology Improvement of Conventional Prosthetic Acrylic Resins. *Journal of Nanomaterials*, 21, 16-25.
28. Tomankova K., Polakova K., Pizova K., Binder S., Havrdova M., Kolarova M., *at.al.* (2015). In vitro cytotoxicity analysis of doxorubicin-loaded/superparamagnetic iron oxide colloidal nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 cell lines. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 949–961.
29. Bae J., Huh M., Ryu B., Do J., Jin S., Moon M., Jung J., Chang Y., *et al.* (2011). The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 9401–9414.
30. Niemirowicz K., Durnaś B, Tokajuk G, Głuszek K, Wilczewska AZ, Misztalewska I, Mystkowska J., Michalak G., Sodo A., Wątek M., Kiziewicz B. & Gózdź S. (2016).

Magnetic nanoparticles as a drug delivery system that enhance fungicidal activity of polyene antibiotics', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6, 2395–2404.

31. Agotegaray M., Campelo A., Zysler R., Gumilar F., Bras C., Gandini A. *et.al.* (2017) Magnetic nanoparticles for drug targeting: From design to insights into systemic toxicity. Preclinical evaluation of hematological, vascular and neurobehavioral toxicology, *Biomaterials Science*,12, 772–783.

32. Asadi Z., Nasrollahi A., Hamidreza K., Vaclav E., Dusek M, Nabiallah M. & Roya P. (2017). Investigation of the complex structure, comparative DNA-binding and DNA cleavage of two water-soluble mono-nuclear lanthanum (III) complexes and cytotoxic activity of chitosan-coated magnetic nanoparticles as drug delivery for the complexes. *Spectrochimica Acta: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*,178,125–135.

33. Ramimoghdam D., Bagheri S. & Hamid S. (2014). Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 368, 207–229.

34. Deb R. & Nagotu A. (2017). Versatility of peroxisomes: An evolving concept.. *Tissue and cell*, 10, 35-46.

35. Bage T., Lunderberg J., Modeer T. & Yucel T. (2010). Signal pathways JNK and NF- κ B, identified by global gene expression profiling, are involved in regulation of TNF- α induced Mpges-1 and Cox-2 expression in gingival fibroblasts. *Genomics*, 11, 241-250 .

36. Sánchez G., Fuentes D., Bello H. (2017) Copper Nanoparticles as Potential Antimicrobial Agent in Disinfecting Root Canals: A Systematic Review. *International journal of odontostomatology*, 10, 547–554.

37. Schade A. *et al.* (2013). Innovative Strategy for MicroRNA Delivery in Human Mesenchymal Stem Cells via Magnetic Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 14,10710–10726.

38. Shear M. (2002). The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: Is it a benign cystic neoplasm? Part 2. Proliferation and genetic studies, *Oral Oncology*, 38, 323–331.

39. Taylor E. & Webster T. (2009). The use of superparamagnetic nanoparticles for prosthetic biofilm prevention. *International journal of nanomedicine*, 4, 145–152.

40. Toropova Y., Golovkin A., Malashicheva A., Korolev D., Gorshkov A., Gareev K., & Galagudza M. (2017). In vitro toxicity of Fe_mO_n, Fe_mO_n-SiO₂ composite, and SiO₂-Fe_mO_n core-shell magnetic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*,12, 593–603.

41. Wang L. & Hu C. (2017). The-antimicrobial-activity-of-nanoparticles--present-situati. *International journal of nanomedicine*, 12,1227–1249.

42. Ying E. & Hwang H. (2010). In vitro evaluation of the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different coatings and different sizes in A3 human T lymphocytes. *Science of the Total Environment*, 408,4475–4481.

43. Aris V. (2012). Using microarrays to measure cellular changes induced by biomaterials. *Characterization of Biomaterials*, 10, 262–285.

44. Augustin E., Czubek B., Kowalczyk A., Stojek Z., & Mazerska Z.(2016) .Improved cytotoxicity and preserved level of cell death induced in colon cancer cells by doxorubicin after its conjugation with iron-oxide magnetic nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, 15, 45–53.

45. Gaharwar U., Meena R. & Rajamani P. (2017). Iron oxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in lymphocytes. *Journal of Applied Toxicology*, 34, 1232–1244.

46. Gorobets O., Gorobets S. & Koralewski M. (2017) . Physiological origin of biogenic magnetic nanoparticles in health and disease: From bacteria to humans. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 4371–4395.
47. Gaspar A., Wagner F., Amaral V., Costa A., Khomchenko V., Santos J., Costa B., & Durães L. (2016) .Development of a biocompatible magnetic nanofluid by incorporating SPIONs in Amazonian oils. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 172, 135–146.
48. Valdíglesias V, Fernández-Bertólez N, Kiliç G, Costa C, Costa S, Fraga S, Bessa MJ, Pásaro E, Teixeira JP, Laffon B.(2016) 'Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives', *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 38, pp. 53–63. doi: 10.1016/j.jtemb.2016.03.017.
49. Kim J., Hegde M. & Jayaraman A. (2010). Co-culture of epithelial cells and bacteria for investigating host-pathogen interactions. *Lab on a Chip*, 10,43–50.
50. Bae J., Huh M., Ryu B., Do J., Jin S., Moon M., Jung J, Chang Y. & Kim E. (2011). The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 9401–9414.
51. Hoskins, C., Cuschieri A. & Wang L. (2012).The cytotoxicity of polycationic iron oxide nanoparticles:Common endpoint assays and alternative approaches for improved understanding of cellular response mechanism.*Journal of Nanobiotechnology*,10, 15-23.
52. Sullivan D., Cruz M., Collins T., Cummins E. & Morris M. (2018). Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 83,355- 364.
53. Uslu B., Biltekin B., Denir S., Özbas., Akbuğa J & Bilir A. (2016) Effects of different forms of chitosan on intercellular junctions of mouse fibroblasts in vitro. *Biotechnic & Histochemistry*, 91, 20-29.
54. Ducreta M.,Montembaultd A., Jossee J.,Pasdeloupa M.,Cellea A. & Fargesa C. (2018). Design and characterization of a chitosan-enrichedfibrin hydrogel for human dental pulp regeneration *Dental Materials*, 17, 22-29.
55. Divya K. & Jisha M. (2015). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Food Hydrocolloids*, 15, 24-31.
56. De Silva R., Pasbakhsh P., Goh K. & Ismail H (2013). Physico-chemical characterisation of chitosan/halloysite composite membranes *Polymer Testing*, 32, 265–271.
57. Laffleura F. & Röttges S. (2019). Mucoadhesive approach for buccal application: Preactivated chitosan. *European Polymer Journal*, 113, 60–66.
58. Sakagami H., Watanabe T., Hoshino T., Hoshino T., Suda N., Mori K., Yasui T., & Sugita Y. (2018). Recent progress of basic studies of natural products and their dental application. *Medicines*, 6,15-26.
59. Sakagami H., Okudaira N., Masuda Y., Amano O., Yokose S., Kanda Y., Suguro M., & Oizumi T. (2017). Induction of apoptosis in human oral keratinocyte by doxorubicin. *Anticancer Research*. 37, 1023-1029.
60. Miyauchi M., Hiraoka M., Oka H., Sato S., Kudo Y., & Ogawa I. (2004). Immunolocalization of COX-1 and COX-2 in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. *Oral Biology*, 49,39–46.
61. Shi H., Nagai J., Sakatsume T., Bandow K., Okudaira N., Uesawa Y., Sakagami H., Tomomura M., Tomomura A., Takao K. & Sugita Y (2018). Quantitative structure-cytotoxicity relationship of 3-(Ncyclicamino) chromone derivatives. *Anticancer Research* 38, 4459- 4467.

62. Sugimori N., Espinoza J., Trung L., Takami A., Kondo Y. & Sasaki M. (2015). Paraptosis cell death induction by the thiamine analog benfotiamine in leukemia cells. *PLoS One*, 10, 23-33.
63. Tomikoshi Y., Nomura M., Okudaira N., Sakagami H. & Wakabayashi H.(2016). Enhancement of cytotoxicity of three apoptosisinducing agents against human oral squamous cell carcinoma cell line by benzoxazinotropone. *In Vivo*, 30, 645-650.
64. Morteza M., Kayhan A., Mohammad A., Shokrgozar W. & Lauren S. (2011). Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. *Chemical Review.*, 111, 3407–3432.
65. Okada N., Hirata A., Murakami Y., Shoji M., Sakagami H. & Fujisawa S. (2005). Induction of cytotoxicity and apoptosis and inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by eugenolrelated compounds. *Anticancer Research*, 25, 3263-3270.
66. Koh T., Machino M., Murakami Y., Umemura N. & Sakagami H. (2013). Cytotoxicity of dental compounds towards human oral squamous cell carcinoma and normal oral cells. *In Vivo* 27, 85-96.
67. Ono M., Kantoh K., Ueki J, Shimada A., Wakabayashi H., Matsuta T., Sakagami H., Kumada H., Hamada N., Kitajima M., Oizumi H. & Oizumi T. (2011). Quest for anti-inflammatory substances using IL- 1 β -stimulated gingival fibroblasts. *In Vivo* 25, 763-768.
68. Bakker A., Klein J. & Burger E.(2003). Mechanotransduction in bone cells proceeds via activation of COX-2, but not COX-1. *Biochemistry Research Communications*, 305, 677—83.
69. Shimizu N., Ozawa Y., Yamaguchi M., Goseki T., Ohzeki K. & Abiko Y. (1999) Induction of COX-2 expression by mechanical tension force in human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontoly*, 69, 670-679.
70. Yuchel T., Nilsson S. & Modeer T. (19989. Signal transduction pathways involved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by interleukin-b and tumor necrosis factor a in human gingival fibroblasts. *Journal of dental research*, 78, 61-68.

19 Anexos

Productos directos e indirectos generados durante la maestría y estancia de investigación. Participación en congresos y misceláneo.

**Constancia de estancia académica realizada en la Universidad de Meikai, Japón.
Enero-abril 2019.**



Ángel David Paulino-González

貴殿に明海大学 Visiting Research Scholar の称号を付与します

期間は2019年4月30日までとします

2019年1月28日

学校法人 明海大学

理事長 宮田



Participación académica (cartel) en el primer encuentro interENES. Abril 2018.



Unidad León
Escuela
Nacional de
Estudios
Superiores



ESCUELA
NACIONAL
de ESTUDIOS
SUPERIORES
UNIDAD MORELIA

Otorgan la presente

CONSTANCIA

a:

Rosa Isela Mosqueda Flores, Silvia Daniela Bravo Ramírez, Juan Rafael Morales Noriega, Alba Sofía García Zamora, Ángel David Paulino González, René García Contreras

Por su participación académica con el trabajo

"Efecto antimicrobiano y citotóxico de las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro: Revisión Sistemática"

En el marco del Primer Encuentro InterENES

*"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
León, Guanajuato a 26 de abril de 2018*

Dra. Laura Susana Acosta Torres
Directora

PRIMER ENCUESTRO
inter
enes

Dra. Diana Tamara Martínez Guiz
Directora

Participación académica (cartel) en el 2° congreso Nacional de escuelas y facultades de odontología. Septiembre 2018.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

La Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León
a través de la División de Educación Continua e Innovación

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a

Rosa Isela Mosqueda Flores, David Paulino González,
Silvia Daniela Bravo Ramírez, René García Contreras

Por su participación académica con el trabajo
**Efecto antimicrobiano y citotóxico de nanopartículas
magnéticas de óxido de hierro de hierro: Revisión sistemática**

llevada a cabo el
28 de septiembre de 2018
en el marco del
Greater Expo ARIC Dental 2018
2° Congreso Nacional de
Facultades y Escuelas de Odontología

“Por mi Raza Hablará el Espíritu”
León, Guanajuato, a 28 de septiembre de 2018



Dra. Laura Susana Acosta Torres
Directora
ENES UNAM, Unidad León

Lic. Juan José Ulloa García
Presidente
Greater ARIC Dental 2018

Dra. Adriana Martínez Martínez
Jefa de la DECI
ENES UNAM, Unidad León

ENESL-UNAM-C092018-00048-IN4

Participación académica en la categoría básica (cartel) en el IV encuentro de investigación del magno congreso de estomatología. Abril 2018.



BUAP

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A través de la Facultad de Estomatología
Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A: Paulino González Angel David, García Contreras René, Scougall Vilchis José Rogelio, Argueta Figueroa Liliana, Torres Gómez Nayely, Vega Arreguin Julio César

Por su participación DESTACADA en la categoría Básica con el tema:

"IMPACTO BIOLÓGICO Y ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE FE3O4 EN CULTIVO CON CÉLULAS ORALES"

en el IV Encuentro de Investigación,
en el marco de las actividades del

V MAGNO CONGRESO INTERNACIONAL EN ESTOMATOLOGÍA

Los días 5, 6 y 7 de abril de 2018 en el Complejo Cultural Universitario
de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 07 de abril de 2018

D. en C. Hortencia Chávez Oseki
Directora

Participación académica (oral) en el encuentro académico de la división mexicana de la IADR. Mayo 2019.



IADR
División Mexicana



IADR
International Association
for Dental Research

International Association for Dental Research, IADR – Mexican Division

Otorga el presente

Reconocimiento

A

Paulino González Ángel David

Por su **Participación Académica** en el Encuentro Académico de la División Mexicana de la Asociación Internacional para la Investigación Dental y presentó la siguiente investigación:

IMPACTO BIOLÓGICO DE NANOPARTÍCULAS FE3O4 Y FE3O4-QUITOSAN EN CULTIVOS MICROBIANOS Y CÉLULAS ORALES;
Coautores: René García Contreras, José Rogelio Scougall Vilchis

Cancún, Quintana Roo, 27 y 28 de mayo de 2019

Dr. Fernando Ángeles Medina
Presidente IADR División Mexicana

Dra. Fabiola Salgado Chavarría
Tesorera IADR División Mexicana

Participación académica (oral) en el XXVI encuentro Nacional y XXVII iberoamericano de investigación en odontología. Noviembre 2018.



Universidad Nacional Autónoma de México
Escuela Nacional de Estudios Superiores
Unidad León



Otorga el presente
RECONOCIMIENTO a:

Angel David Paulino González, José Rogelio Scougall Vilchis
Liliana Argueta Figueroa, Nayely Torres Gómez
Julio César Vega Arreguin

Por su presentación oral con el tema

IMPACTO BIOLÓGICO DE NANOPARTÍCULAS DE FE3O4 EN CULTIVO CON CÉLULAS ORALES Y MACRÓFAGOS.



XXVI ENCUENTRO NACIONAL Y XVII IBEROAMERICANO DE
**Investigación
en Odontología**



Laura Susana Acosta Torres
Directora
Escuela Nacional de Estudios Superiores,
Unidad León

León, Gto. 7 al 9 de Noviembre de 2018



Dr. Jorge Alanís Tavira
Presidente
Sociedad Nacional de Investigadores
en Odontología (SNIC) A.C.

Participación académica (cartel) en el foro estatal de investigación en salud.
Diciembre 2017.



The image shows a certificate of recognition from the Secretaría de Salud del Estado de Guanajuato. At the top, there are logos for FEIS (Foro Estatal de Investigación en Salud Guanajuato), the state health department, CEIS (Comisión Estatal de Investigación en Salud), and the School of Medicine. The main text reads: 'OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA Ángel David Paulino González'. Below this, it states: 'Por su valiosa participación con el trabajo de investigación: "Impacto biológico y antimicrobiano de nano partículas de Fe3O4 en cultivo con células orales", en el 24° Concurso Estatal de Investigación para la Salud, en el marco del Foro Estatal de Investigación en Salud 2017.' There are three signatures and their corresponding titles: Dr. Daniel Alberto Díaz Martínez, Secretary of Health; Dr. Jesús Vázquez Esquivel, Director of the School of Medicine at Universidad de Celaya; and Dr. Tonatiuh García Campos, Director of the Division of Health Sciences at Universidad de Guanajuato. The date is 'LEÓN, QTO. 14 Y 15 DE DICIEMBRE DE 2017'.

FEIS Foro Estatal de Investigación en Salud GUANAJUATO

LA SECRETARÍA DE SALUD DEL ESTADO DE GUANAJUATO

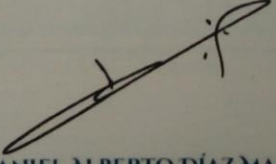
CEIS

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

Ángel David Paulino González

Por su valiosa participación con el trabajo de investigación:
"Impacto biológico y antimicrobiano de nano partículas de Fe₃O₄ en cultivo con células orales", en el 24° Concurso Estatal de Investigación para la Salud, en el marco del Foro Estatal de Investigación en Salud 2017.


DR. DANIEL ALBERTO DÍAZ MARTÍNEZ
SECRETARIO DE SALUD DEL ESTADO DE GUANAJUATO


DR. J. JESÚS VÁZQUEZ ESQUIVEL
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CELAYA


DR. TONATIUH GARCÍA CAMPOS
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

LEÓN, QTO. 14 Y 15 DE DICIEMBRE DE 2017

Participación académica (oral) en el encuentro académico de la división mexicana de la IADR. Mayo 2019.



Envío del trabajo de investigación a la sesión general de la IADR en Vancouver, Canadá, junio 2019. (Presentado por el Dr. René García Contreras).



VERIFICATION OF ATTENDANCE AND PRESENTATION

The International Association for Dental Research verifies that:

Rene Garcia-Contreras, D.D.S.

attended the 2019 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition
in Vancouver, BC, Canada, June 19-22, 2019, and presented the following research:

**Biological Evaluation of FE₃O₄ Nanoparticles for Potential Applications
in Dentistry**

ADA C-E-R-P® | Continuing Education
Recognition Program

The International Association for Dental Research
is an ADA CERP Recognized Provider.

ADA CERP is a service of the American Dental Association to assist dental professionals in identifying quality providers of dental education. ADA CERP does not approve or endorse individual courses or instructors, nor does it imply acceptance of credit hours by boards of dentistry.

Concerns or complaints about a CE provider may be directed to the provider or the ADA CERP at www.ada.org/cerp.

Christopher H. Fox, D.M.D., D.M.Sc.
Chief Executive Officer, IADR/AADR

Coautor de artículo de investigación publicado en el no. 21 de la revista mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología. Junio 2018.



Ciudad de México, 18 de junio de 2018.

Dra. Ma. Concepción Arenas-Arrocena

Por este medio hago de su conocimiento que el artículo en coautoría con Liliana Argueta-Figueroa, Daniela Mesta-Pichardo, Nayely Torres-Gómez, Omar Martínez-Álvarez, Ángel David Paulino-González, intitulado "Acrílico termopolimerizable enriquecido con nanopartículas de cobre: evaluación antibacteriana y citotóxica" ha sido aceptado para ser publicado en el número 21 de *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología* correspondiente a julio-diciembre de 2018. Esperamos tener el texto publicado en el transcurso de las próximas semanas.

Sin más por ahora, reciba un cordial saludo.

Coautor en artículo misceláneo publicado en el volumen 21. De la revista new food industry. Septiembre 2019.



組織の活性化と人材の育成～

—分野を超えたコラボの必要性—

Improving the working environment and nurturing human resources:
—Necessity of collaboration across fields—

坂上 宏 (SAKAGAMI Hiroshi)¹, 虻川 東嗣 (ABUKAWA Harutsugi)¹, 友村 美根子 (TOMOMURA Mineko)²,
大石 隆介 (OISHI Ryusuke)³, 白瀧 義明 (SHIRATAKI Yoshiaki)⁴, 中谷 祥恵 (NAKATANI Sachie)⁴,
真殿 仁美 (MADONO Hitomi)⁵, 小川 由香里 (OGAWA Yukari)⁶, 天野 修司 (AMANO Shuji)⁶, 刀祢 重信
(TONE Shigenobu)⁷, 飯島 洋介 (IIZIMA Yosuke)⁸, 肖 黎 (XIAO Li)⁹, エンジェル・パウリノ (PAURINO Angel)¹⁰

¹ 明海大学歯学部, ² 明海大学保健医療学部, ³ 明海大学経済学部, ⁴ 城西大学薬学部, ⁵ 城西大学現代政策学部,

⁶ 日本医療科学大学保健医療学部, ⁷ 東京電機大学・理工学部, ⁸ 埼玉医科大学総合医療センター,

⁹ 日本歯科大学生命歯学部, ¹⁰ メキシコ国立自治大学

Coautor de artículo de investigación publicado en el volumen 34 de la revista *in vivo*. Marzo 2020.

in vivo 34: xxx-xxx (2020)
doi:10.21873/invivo.11xxx

No: 4776-N
Please mark the appropriate section for this paper
<input checked="" type="checkbox"/> Experimental
<input type="checkbox"/> Clinical

Augmentation of Neurotoxicity of Anticancer Drugs by X-Ray Irradiation

GIICHIROU NAKAYA¹, HIROSHI SAKAGAMI², YUKARI KOGA-OGAWA¹, AKIYOSHI SHIROTO¹, TADAMASA NOBESAWA¹, DAISUKE UEDA¹, SACHIE NAKATANI³, KENJI KOBATA³, YOSUKE IJIMA⁴, SHIGENOBU TONE⁵, ANGEL DAVID-GONZALEZ⁶, RENE GARCIA-CONTRERAS⁶, MINEKO TOMOMURA², SHINJI KITO², NOBUAKI TAMURA² and HIROSHI TAKESHIMA²

¹Faculty of Health Sciences, Nihon Institute of Medical Science, Saitama, Japan;

²Meikai University School of Dentistry, Saitama, Japan;

³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama, Japan;

⁴Saitama Medical Center, Saitama Medical University, Saitama, Japan;

⁵Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Denki University, Saitama, Japan;

⁶National School of Higher Education, Leon Unit, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

Abstract. *Background:* In order to investigate the combination effect of anticancer drugs and X-ray irradiation on neurotoxic side-effects (neurotoxicity), a method that provides homogeneously X-ray-irradiated cells

X-Rays are used for many purposes in various fields. This includes the visualization of the distribution and therapeutic effects of drugs by X-ray computed tomography (1); the

Coautor en artículo misceláneo publicado en el volumen 62. De la revista new food industry. Febrero 2020.



Importance of international communication skills

~ Experience and overview of a Mexican student in academic exchange at Meikai University

Ángel Paulino-González¹, Hiroshi Sakagami², René García-Contreras¹,
Yosuke Iijima³ and Masahiko Kobayashi⁴

Introduction

The world is currently in a fast interconnection that promotes the approach between cultures, countries, industries and universities. Japan and Mexico have a very close friendship that has become stronger in recent years in several fields. According to official reports, about 5,000 Japanese live in Mexico, 2,500 in the Bajío region and approximately 800 in Leon city, where the ENES University is located. In this region, many elementary and high schools include in their academic programs the learning of the Japanese language for their students, and many young people are so excited to learn it. Currently, Japanese citizens that live in Mexico have improved the economy of this region, and the contact and cultural

fraternity and respect. Some experiences of a Mexican student at the University of Meikai will be described.

Academic life in dentistry and research:

First, the minimum time required to become a dentist in Japan is 7 years, while that required to obtain the degree in Mexico is 5 years. In Japan, the students, especially those who prepare the national exam, study in the halls, cafeterias and library, many in groups and some only with themselves, this behavior is similar in Mexico during tests period. A day before the exam I could see how the teachers, family and friends motivate the students to pass the national exam and that was very exciting for me. In Mexico, the knowledge test is not mandatory for all

Coautor del manual de prácticas de laboratorio para la enseñanza del aislamiento, cultivo y caracterización de células madre mesenquimales de la pulpa dental humana. 2019.



Autores

- Dr. René García Contreras
- Dra. Laura Susana Acosta Torres
- Dra. Ma. Concepción Arenas Arroccena

*Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria (LII),
Área de Nanoestructuras y Biomateriales,
Escuela Nacional de Estudios Superiores,
Unidad León, UNAM.*

- Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.*

- LO. Angel David Paulino González

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Odontológicas, Escuela
Nacional de Estudios Superiores, Unidad León, UNAM.*

- C. Nathalia Estefanía López Calleja
- C. María de Jesús Guerrero

*Estudiantes de la Licenciatura en Odontología Escuela Nacional
de Estudios Superiores, Unidad León, UNAM.*