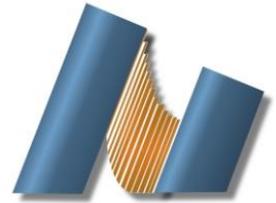




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA



LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA

EJE DE BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA BIOCMPATIBILIDAD DE
NANOHIIDROXIAPATITA DOPADA CON EUROPIO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA

EMMANUEL GAONA CARRANZA

DIRECTOR DE TESIS

DRA. KARLA OYUKY JUÁREZ MORENO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA ENERO 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.

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. obtenidos de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

Emmanuel Gaona Carranza

Dedicatoria

A mi madre, por todo su apoyo

Agradecimientos

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitirme realizar mi licenciatura en sus instalaciones, además de facilitarme los recursos necesarios para el desarrollo de la misma en tiempo y forma. Al personal que labora en el CNyN, especialmente a Isabel Pérez Montfort y Laura A. Rosales Vázquez por todo su apoyo y cariño durante mi formación universitaria.

Agradezco a mi asesora la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno por su invaluable guía y soporte durante el proceso de desarrollo de esta tesis. Además, por el apoyo personal que recibí, por las tardes de charlas y té. Muchas gracias.

Quiero agradecer a los miembros del grupo de colaboración UNAM – UC San Diego, quienes también son miembros de mi comité de tesis, la Dra. Olivia Graeve, el Dr. Manuel Herrera Zaldivar y al M. C. Fabián Martínez Pallares, además, a el jefe del Departamento de Bionanotecnología del CNyN el Dr. Rafael Vázquez Duhalt por su valiosa guía durante el desarrollo de este proyecto y sus observaciones al manuscrito de tesis.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bionanotecnología del CNyN-UNAM con fondos del proyecto CONACYT INFR-269071. Agradezco a la Dra. Katrin Quester y a la M.C. Itandehui Betanzo, Técnicos Académicos del Departamento de Bionanotecnología del CNyN-UNAM y a los miembros del Departamento por su apoyo.

Agradezco a mi familia, en especial a mi madre, quienes siempre me dan su apoyo incondicional y cariño en cada proyecto que me propongo.

También, agradezco a mis amigos por su compañía, aprecio y apoyo durante estos 4 años de vida universitaria, por estar conmigo en las buenas y en las malas. Gracias.

Tabla de contenido

	Página
Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Lista de figuras	8
Capítulo 1. Introducción	9
1.1 Regeneración de tejido óseo.	9
1.2 Ingeniería de tejidos.	9
1.3 Andamios celulares.	11
1.4 La nanohidroxiapatita en la ingeniería de tejido óseo.	11
1.5 Biocompatibilidad de las nanopartículas.	14
1.6 Antecedentes.	14
1.7 Hipótesis.	18
1.8 Objetivos.	18
1.8.1 Objetivo general.	18
1.8.2 Objetivos específicos.	18
Capítulo 2. Metodología	19
2.1 Generalidades de la nanohidroxiapatita.	19
2.2 Conformación de discos de nHA y nHA:Eu.	19

2.3 Reactivos utilizados en los ensayos de biocompatibilidad.	19
2.4 Cultivo celular.	20
2.5 Ensayo de proliferación celular mediante reducción de resazurina.	22
2.6 Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno en preosteoblastos y fibroblastos.	23
2.7 Ensayo de diferenciación celular de preosteoblastos mediante la detección de fosfatasa alcalina.	24
2.8 Evaluación de la hemocompatibilidad de los discos de nHA y nHA:Eu.	25
Capítulo 3. Resultados.	28
3.1 Resultados de la proliferación celular de preosteoblastos MC3T3-E1 cultivados sobre discos de nHA y nHA:Eu.	28
3.2 Resultados de la proliferación celular de fibroblastos L929 cultivados sobre discos de nHA y nHA:Eu.	31
3.3 Determinación del estrés oxidativo inducido en preosteoblastos MC3T3 incubados con nHA y nHA:Eu.	33
3.4 Determinación del estrés oxidativo en fibroblastos L929.	35
3.5 Ensayo de diferenciación de preosteoblastos murinos en presencia de nHA y nHA:Eu.	36
3.6 Ensayo de hemólisis.	38

Capítulo 4. Discusión	40
4.1 Ensayo de proliferación celular.	40
4.2 Producción intracelular de especies reactivas de oxígeno en células cultivadas en nHA y nHA:Eu.	42
4.3 Diferenciación osteoblástica.	43
4.4 Evaluación de la hemocompatibilidad.	44
Capítulo 5. Conclusiones	46
Literatura citada	47
Anexos	52
Anexo I. Difracción de rayos-X y porcentaje de TCP.	52

Lista de figuras

Figura 1. Estructura atómica de la hidroxiapatita.	12
Figura 2. Estructura jerárquica del hueso en varias escalas de longitud.	13
Figura 3. Fórmula general de los minerales de apatita.	15
Figura 4. Proliferación de preosteoblastos murinos MC3T3-E1 sobre discos de nHA.	28
Figura 5. Proliferación celular de preosteoblastos murinos MC3T3-E1 sobre discos de nHA:Eu.	30
Figura 6. Proliferación de fibroblastos murinos L929 sobre discos de nHA.	31
Figura 7. Proliferación de fibroblastos murinos L929 sobre discos de nHA:Eu.	32
Figura 8. Cuantificación de las células que presentan estrés oxidativo del cultivo de preosteoblastos murinos MC3T3-E1 al ser incubados en presencia de las nanopartículas de HA y HA:Eu.	34
Figura 9. Cuantificación de células que presentan fluorescencia del cultivo de fibroblastos murinos L929 incubados por 24 y 72 horas en presencia de las nanopartículas de HA y HA:Eu.	35
Figura 10. Cuantificación de la cantidad de fosfatasa alcalina para determinar la diferenciación de preosteoblastos murinos MC3T3-E1.	36
Figura 11. Micrografías del proceso de diferenciación de los preosteoblastos.	37
Figura 12. Porcentaje de hemólisis generado en los eritrocitos por la incubación con los discos de nHA y nHA:Eu.	39

Capítulo 1. Introducción

1.1 Regeneración de tejido óseo

Los padecimientos clínicos del sistema óseo como pérdida debido a traumatismo, infecciones y tumores constituyen un problema agudo de salud pública. Tan solo en los Estados Unidos se reportan alrededor de 6.5 millones de fracturas óseas por año, de las cuales alrededor del 15% son difíciles de tratar (Braddock *et al.*, 2001).

Se han desarrollado diversas terapias para la reparación del hueso como lo es reforzar con metales, cementos sintéticos o biocerámicas. Sin embargo, estos sustitutos están lejos de ser los ideales ya que los materiales sintéticos se desgastan y no presentan el comportamiento biológico del hueso real (Goldberg *et al.*, 1987). Es por estas dificultades que se ha buscado sustituir al hueso dañado a través del injerto de tejido óseo directamente al paciente. Éstos injertos pueden clasificarse como autoinjertos (hueso del mismo paciente), aloinjertos (hueso de una persona injertado a otra) o xenoinjertos (hueso de un animal injertado a una persona). No obstante, a pesar de que los injertos son un tejido biológico, presentan la dificultad de aceptación de acuerdo a la salud del paciente, riesgo de transmisión de enfermedades y la capacidad de provocar una respuesta inmune indeseada (Costantino y Friedman, 1994).

Investigaciones recientes se han enfocado en la ingeniería de tejido óseo, en el que se propone la aplicación de materiales especialmente diseñados para facilitar la regeneración o reemplazo natural del hueso (Langer y Vacanti, 1993).

1.2 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario en el que se aplican los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida para mantener, restaurar o mejorar la función de los tejidos deficientes o que han sido perdidos debido a diferentes condiciones patológicas (Skalak y Fox, 1991).

La ingeniería de tejidos ha tenido un gran avance en los últimos 10 años, ofreciendo el potencial para regenerar casi todos los tejidos y órganos del cuerpo humano, junto con la medicina regenerativa, constituyen un área floreciente de la investigación en nuevos tratamientos potenciales para muchas más condiciones patológicas. Tanto ha sido el avance de este campo que se espera que para el año 2022 el mercado mundial alcance los 11.5 mil millones de dólares (Grand View Research, 2018).

Los objetivos de la ingeniería de tejidos mencionados anteriormente –mantener, restaurar o mejorar la función de tejidos– se logran desarrollando sustitutos biológicos o técnicas de reconstrucción de tejidos. Las tres estrategias generales adoptadas para la generación de nuevo tejido son:

1. *Implantación de células aisladas o sustitutos celulares*

Esta estrategia evita las complicaciones de la cirugía, permite el reemplazo sólo de aquellas células que proporcionan las funciones necesarias y su manipulación antes de la implantación. Sus limitaciones radican en la incapacidad de las células implantadas en preservar su función, y el rechazo inmunológico de las mismas.

2. *Sustancias inductoras de tejido*

Esta estrategia se basa en la purificación y producción a gran escala de moléculas señalizadoras apropiadas, como factores de crecimiento y en muchos casos, el desarrollo de métodos de entrega de estas moléculas.

3. *Colocación de células sobre o dentro de matrices celulares*

En este método, las células unidas a las matrices se implantan y son incorporadas al organismo. Las matrices celulares están conformadas de materiales biocompatibles como el colágeno o polímeros sintéticos. El rechazo por parte del sistema inmune se evita con la aplicación de medicamentos inmunosupresores o idealmente, utilizando células autólogas, es decir, células del paciente.

Esta última técnica es la más frecuentemente asociada con el concepto de ingeniería de tejidos, esto es, el uso de células vivas cultivadas sobre un andamio celular para crear partes de tejido que puedan ser implantadas (Langer y Vacanti 1993).

1.3 Andamios celulares

Durante las últimas dos décadas se han desarrollado nuevos materiales de andamiaje potencialmente aplicables a la ingeniería de tejidos. Los andamios celulares se definen como biomateriales tridimensionales sólidos y porosos diseñados para realizar las siguientes funciones (Langer y Tirrell, 2004):

- I. Promover las interacciones célula-biomaterial, adhesión celular y depósito de matriz extracelular.
- II. Permitir un eficiente transporte de gases, nutrientes y factores de regulación para promover la proliferación, supervivencia y diferenciación celular.
- III. Poseer una tasa considerable de biodegradación que se aproxime a la tasa de regeneración tisular de interés.
- IV. Evitar la inflamación o toxicidad *in vivo*.

Una clase importante de biomateriales para la reparación ósea son las biocerámicas como la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico, que, al ser similares al componente mineral del hueso natural, han mostrado buena osteoconductividad y capacidad de unión ósea (LeGeros, 2002).

1.4 La nanohidroxiapatita en la ingeniería de tejido óseo

Las biocerámicas son una clase de cerámicas utilizadas para la reparación y el reemplazo de tejido dañado del sistema musculoesquelético. Las biocerámicas absorbibles más utilizadas incluyen los fosfatos de calcio (CaPs), éstos se encuentran presentes en hueso, dientes, y tendones de mamíferos, brindándoles dureza y estabilidad. El miembro más utilizado de la familia de los CaPs es la hidroxiapatita (HA) (Dorozhkin, 2009).

La hidroxiapatita ((Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) es el componente principal de la parte mineral del hueso. Sin embargo, no se encuentra en su forma pura ya que se encuentra asociada con grupos menores o elementos (p. ej. CO₃²⁻, HPO₄²⁻, Na⁺, Mg²⁺) y trazas de elementos como Sr²⁺, K⁺, Cl⁻ y F⁻, algunos de ellos al nivel de partes por millón, los cuales juegan un papel vital en reacciones bioquímicas asociadas con el metabolismo óseo (Skinner, 2005).

La composición química de la hidroxiapatita en el hueso varía debido a que presenta diferentes sitios cristalográficos en donde ocurren intercambios atómicos. Algunos complejos aniónicos pueden reemplazar el grupo fosfato, y un gran número de cationes metálicos bivalentes y trivalentes pueden sustituir al calcio (Hughes y Rakovan, 2002) como se aprecia en la **Figura 1**.

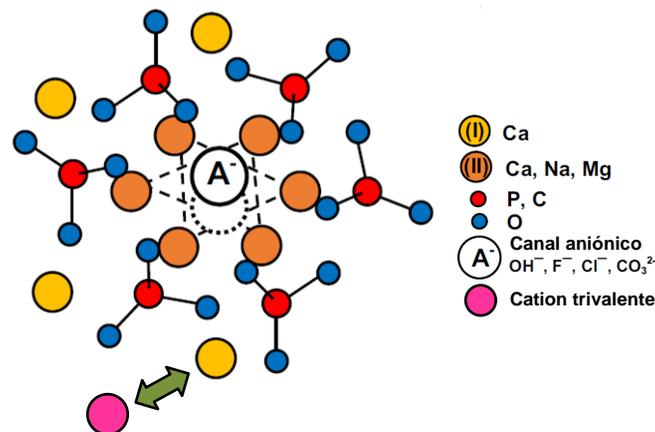


Figura 1. Estructura atómica de la hidroxiapatita. Se muestra la capacidad de sustitución del calcio por cationes metálicos trivalentes. Modificado de Šupová, Monika. (2015).

Esta característica es útil ya que las hidroxiapatitas sustituidas simulan la bioapatita real y pueden ser utilizadas como relleno para un biocompuesto, como andamio para el tejido óseo en crecimiento, o en forma de cemento para reparar y reemplazar partes dañadas del sistema musculoesquelético.

Entre las diversas estructuras de la hidroxiapatita, la hidroxiapatita nanométrica, también conocida como nanopartículas de HA han generado un gran interés en la investigación científica básica y en varias aplicaciones biomédicas (Sadat-Shojai 2010). La HA nanométrica con un tamaño inferior a 100 nm en al menos una dirección cristalográfica, tiene una alta

actividad superficial y una estructura ultra fina, similar al mineral que se encuentra en los tejidos óseos (Vallet-Regí y González-Calbet 2004). Es bien sabido que las biocerámicas que imitan el mineral óseo en su composición y estructura pueden promover más fácilmente la osteointegración y la posterior formación de tejido óseo. De hecho, dado que la HA biológica que se encuentra en los tejidos duros fisiológicos son nanocristales con forma de placa o varilla con un grosor de unos pocos nanómetros y una longitud de decenas de nanómetros, se cree que las nanoestructuras de HA con morfología similar a la de los minerales naturales del hueso son los mejores materiales para utilizarse en la reposición y regeneración ósea (Vallet-Regí y González-Calbet 2004, Cai et al. 2007) (**Figura 2**).

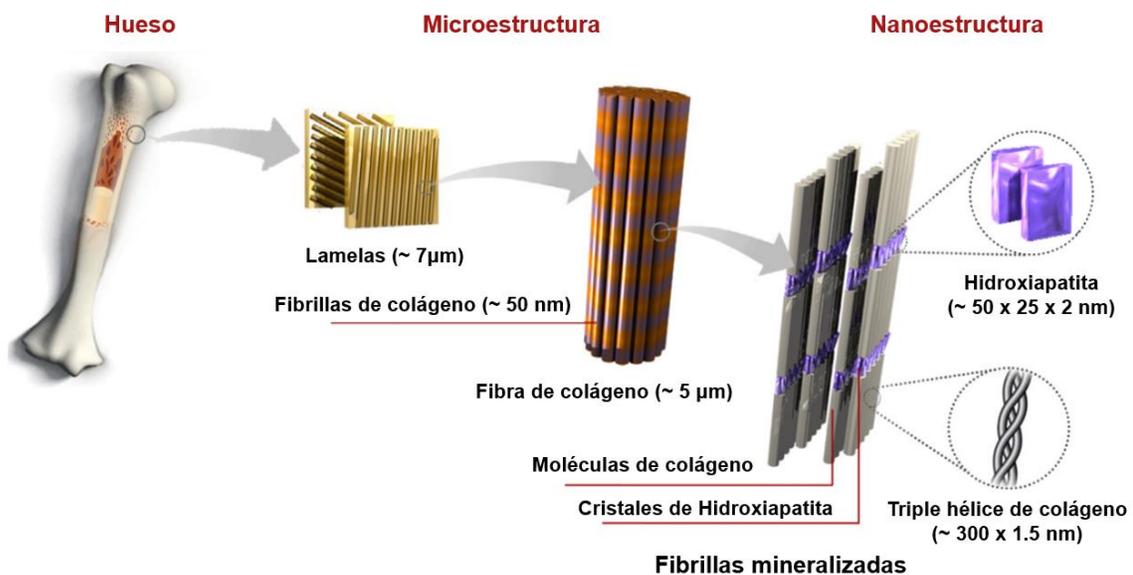


Figura 2. Estructura jerárquica del hueso en varias escalas de longitud. De manera general, la microestructura consiste en laminillas formadas por fibras de colágeno. En la nanoescala, el marco estructural son fibras de colágeno compuestas de ramilletes de fibrillas de colágeno mineralizadas. Modificado de Sadat-Shojai y colaboradores (2013).

Es por esto que, en los últimos años, los biocerámicas y los biocompuestos basados en HA nanométrica han sido los materiales más prometedores para diversas aplicaciones biomédicas.

1.5 Biocompatibilidad de las nanopartículas

En los últimos años, las nanopartículas han ganado reconocimiento en diversas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Tan solo en 2006 existían más de 250 productos basados en nanopartículas en una línea farmacéutica (Dobrovolskaia et al. 2008). Una nanopartícula utilizada para tratamiento o diagnóstico está diseñada para administrar el medicamento en el sitio de acción o realizar su función en un sitio deseado sin ser tóxica para el cuerpo. Para que una nanopartícula sea considerada biocompatible, es extremadamente importante comprender sus posibles interacciones con el sistema biológico.

Diversos factores como el tamaño, la forma y la composición definen las propiedades bioquímicas de las nanopartículas. Además, los efectos adversos en el sistema huésped determinan enormemente el uso del nanomaterial como material biocompatible. Por lo tanto, es necesario un enfoque *bottom-up* del diseño del bionanomaterial mediante la evaluación de la influencia de sus propiedades físicas y químicas del material en el sistema biológico (Evani y Ramasubramanian 2011).

1.6 ANTECEDENTES

En el presente trabajo se utilizaron nanopartículas de hidroxiapatita (nHA) y nanopartículas de hidroxiapatita dopada con europio (nHA:Eu), sin tratamiento térmico y tratadas térmicamente. Como parte de las evaluaciones nanotoxicológicas de estos materiales, se evaluó la biocompatibilidad de estas nanopartículas en dos líneas celulares: preosteoblastos y fibroblastos murinos, con ello será posible presentar evidencias para garantizar su seguridad biológica para futuras aplicaciones biomédicas. Se evaluaron las diferencias en la proliferación celular, generación de estrés oxidativo, diferenciación celular y hemólisis ocasionadas por el dopado de la estructura química del material con los iones de europio o por los diferentes tratamientos térmicos a los que fueron sometidos.

La hidroxiapatita es considerada un compuesto no estequiométrico con capacidad de aceptar variaciones composicionales en sus tres subredes (**Figura 3**).



M = Ca, Sr, Ba, Cd, Pb, Mg, Na, K...

Z = P, CO₃, V, As, S, Si, Ge, Cr, B...

X = OH, CO₃, O, CO₂, F, Cl, Br, vacancias...

Figura 3. Fórmula general de los minerales de apatita. Se observa la fórmula general de los minerales de apatita y sustituciones potenciales en las tres subredes.

Estas variaciones tienen un significado fisiológico notable, ya que el tejido más joven y menos cristalino, puede desarrollarse y crecer más rápido, al tiempo que almacena otros elementos que el cuerpo necesita durante su crecimiento; esto se debe a la calidad no estequiométrica de HA que contempla la inclusión sustitutiva de diferentes cantidades de iones como el Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Sr²⁺, Cl⁻, F, HPO₄²⁻, etc. (Vallet-Regí 1997).

Esta capacidad de intercambiar iones en la estructura permite diseñar, desarrollar y caracterizar nuevos y mejores fosfatos de calcio para ciertas aplicaciones específicas. Se sabe que la tasa de regeneración ósea depende de varios factores tales como porosidad, composición, solubilidad y presencia de ciertos elementos que, al ser liberados durante la reabsorción del material cerámico, facilitan la regeneración ósea llevada a cabo por los osteoblastos. La tendencia actual es, por lo tanto, obtener biocerámicas de fosfato de calcio parcialmente sustituidas por estos elementos (Vallet-Regí 2004).

La sustitución elemental (dopado) de la HA con iones de tierras raras se ha utilizado en diversas aplicaciones biomédicas: mejoramiento de contraste en adquisición de imágenes por resonancia magnética y rayos-X así como para ser aplicado como sonda fluorescente (De Araujo 2007, Jagannathan 1995, Malmberg 2008). Recientemente, Nelson y colaboradores (2016) encontraron que nanopartículas de ceria (CeO₂) mostraron capacidad antioxidante mediante el ciclo redox entre los iones Ce³⁺ y Ce⁴⁺ en la superficie de las nanopartículas. Además, en el año 2013 Lee y colaboradores demostraron que el uso de tierras raras en nanocristales reduce las especies reactivas de oxígeno en células mesenquimales y fibroblastos humanos.

Se sabe que la HA exhibe buenas propiedades como biomaterial tales como biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad, unión directa al hueso, etc. Entre la amplia gama de fosfatos de calcio disponibles, es importante conocer la estrecha relación entre la relación Ca/P, acidez y solubilidad. Por lo tanto, cuanto más baja es la relación Ca/P, mayor es la acidez y solubilidad del material. Para $Ca = P < 1$, tanto la acidez como la solubilidad son extremadamente altas, y ambos parámetros disminuyen sustancialmente para proporciones Ca/P cercanas a 1.67, que es el valor de la HA estequiométrica (Aoki 1994).

Entre las diversas estructuras de la HA, la HA nanométrica ha generado gran interés en la investigación biomédica debido a que diversos estudios han demostrado que éstos biomateriales cerámicos basados en HA nanométrica exhiben una capacidad de reabsorción mejorada y una bioactividad mucho mayor que las cerámicas micro estructuradas (Dong et al 2009, Dorozhkin 2010). Además, la HA nanoestructurada posee una mayor área de superficie y rugosidad, lo que resulta en una mejor adhesión e interacciones entre la célula y la matriz extra celular (Wang et al 2010, Webster et al 2001).

De manera general, es posible sintetizar nanopartículas de fosfatos de calcio mediante tres diferentes métodos: síntesis seca, síntesis húmeda y síntesis a altas temperaturas. Los métodos de síntesis seca incluyen métodos de estado sólido y mecano-químicos. Las metodologías húmedas incluyen la precipitación química, hidrólisis, sol-gel, método hidrotermal y sonoquímico. Por último, los procesos a altas temperaturas incluyen el método de combustión y el de pirólisis.

La característica principal de la síntesis por combustión de la HA es su capacidad para producir rápidamente polvos de alta pureza en una operación de un solo paso. Además, las ventajas de este método de síntesis radican en el relativo bajo costo de las materias primas, un proceso de preparación relativamente simple y una buena homogeneidad química del polvo sintetizado como resultado de la mezcla de los constituyentes (Sadat-Shojai 2013). Las nanopartículas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas mediante la síntesis por

combustión en un solo paso, lo que permite la fácil incorporación de dopantes de tierras raras en su estructura (Graeve *et al* 2010).

Ya que las condiciones de síntesis influyen fuertemente en el tamaño del cristal, morfología y estructura de las nanopartículas, es común encontrar la coexistencia de fases de hidroxiapatita y fosfato β -tricálcico (β -TCP, por sus siglas en inglés *β -tricalcium phosphate*) en distintas proporciones en ellas. Además, cuando la HA se calienta a 1050°C, se convierte parcialmente a β -TCP (Aoki 1994). Es por esto que es probable encontrar fases de TCP en las nanopartículas tratadas térmicamente.

Diversas investigaciones se han enfocado en el papel que juegan tanto el tamaño como la cristalinidad de las nanopartículas en la adhesión y proliferación celular. En el año 2009, Liu y colaboradores evaluaron nanopartículas de hidroxiapatita de distintos tamaños para cultivar células madre mesenquimales de conejo sobre ellas y encontraron que, al disminuir el tamaño de la nanopartícula se potenciaban los efectos de proliferación.

De igual manera, Hu y colaboradores (2007) mostraron el papel de la cristalinidad al comparar nanopartículas de fosfato amorfo con nanopartículas de hidroxiapatita cristalina. Encontraron que la fase cristalina promueve una mayor proliferación, mientras que la fase amorfa genera una mayor tasa de diferenciación de las células madre mesenquimales de conejo a osteoblastos.

Por otra parte, los osteoblastos son las células mayoritariamente utilizadas en los estudios relacionados con la regeneración de tejido óseo. Los osteoblastos son un tipo de fibroblasto especializados que secretan y mineralizan la matriz ósea. La matriz extracelular mineralizada está compuesta principalmente por colágeno tipo I y pequeñas pero significativas cantidades de osteocalcina, proteína Gla de matriz, sialoproteína ósea, proteínas morfogenéticas óseas, TGF- β y el mineral inorgánico hidroxiapatita. La diferenciación osteoblástica se puede caracterizar en tres etapas: (a) proliferación celular, (b) maduración de la matriz y (c) mineralización de la matriz extracelular. La fase de maduración de la matriz se caracteriza por la expresión máxima de la fosfatasa alcalina,

mientras que su posterior disminución es una de las características durante la mineralización de la matriz extracelular. Durante el proceso de diferenciación, el osteoblasto experimenta una transformación morfológica dramática que va desde una célula poligonal a una célula que extiende dendritas hacia el frente de mineralización. El proceso de mineralización de los osteoblastos en cultivo *in vitro* se ha utilizado como modelo para probar los efectos de tratamientos farmacológicos y carga mecánica sobre la diferenciación de las células y formación ósea (Bonewald 2011, Promocell 2018).

1.7 HIPÓTESIS

La nanohidroxiapatita dopada con europio (nHA:Eu) al ser un material biocompatible, permitirá la proliferación celular además de promover la diferenciación osteoblástica.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo general

Estudiar la biocompatibilidad *in vitro* de nanohidroxiapatita (nHA) y nanohidroxiapatita dopada con Eu (nHA:Eu) en dos líneas celulares; preosteoblastos (MC3T3-E1 Subclona 4) y fibroblastos murinos (L929).

1.8.2 Objetivos específicos

1. Estudiar la proliferación de preosteoblastos y fibroblastos murinos cultivados sobre discos de nHA y nHA:Eu.
2. Determinar la generación de especies reactivas de oxígeno en las células cultivadas con nHA y nHA:Eu.
3. Analizar la diferenciación inducida por ambos materiales en preosteoblastos murinos.
4. Estudiar la hemocompatibilidad de los discos de nHA y nHA:Eu.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Generalidades de la nanohidroxiapatita

Las nanopartículas de hidroxiapatita (nHA) e hidroxiapatita dopada con europio (nHA:Eu) fueron proporcionadas por el M.C Fabián Martínez y la Dra. Olivia Graeve del Departamento de Ingeniería Mecánica y Aeroespacial de la Universidad de California, San Diego, U.S.A. Los materiales fueron sintetizados utilizando el método de combustión descrito por Zavala-Sánchez (Zavala-Sánchez et al, 2015). Cabe mencionar que las nanopartículas presentan una distribución de tamaño de 100 a 200 nm aproximadamente.

2.2 Conformación de discos de nHA y nHA:Eu

Se elaboraron de forma independiente, dos tipos de discos, el primero compuesto por nanopartículas de hidroxiapatita (nHA) y el segundo con nHA dopada con europio (nHA:Eu). Para ello se utilizaron 50 ± 5 mg de nHA o nHA:Eu ambas en forma de polvo. Se conformaron los discos utilizando una prensa manual para pastillas utilizando dados de 6 mm de diámetro bajo una presión de 6 MPa.

Se fabricaron discos con tres tipos de nHA y nHA:Eu: sin tratamiento térmico, con 10 h de horneado a 1000°C y 20 h de horneado a 1000°C.

2.3 Reactivos utilizados en los ensayos de biocompatibilidad

- ♦ Solución salina amortiguadora por fosfatos 1x, estéril, pH = 7.4 (PBS, por sus siglas en inglés, *Phosphate Buffered Saline*), mantenida en refrigeración a 4°C.
- ♦ Solución tripsina / EDTA 1x, almacenada a -20°C hasta su uso.
- ♦ Dimetilsulfóxido (DMSO) $\geq 99\%$.
- ♦ Disolución 700 μ M del reactivo C12-resazurina (Life Technologies, L34951), mantenida en refrigeración a 4°C y protegida de la luz.
- ♦ Image-It LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit (Invitrogen, I36007).
- ♦ Disolución BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) / NBT (nitroazul de tetrazolio), preparada al momento de uso.

- ♦ Solución 150 mM de NaCl. Se utilizaron 2.1915 g de NaCl en 250 mL de agua milli-Q.
- ♦ Disolución 20% Triton X-100. Se utilizaron 5 mL de Triton X-100 en 20 mL de agua milli-Q, se agitó y sonicó para disolver. Se almacenó durante un día a temperatura ambiente previo a utilizarse.
- ♦ Los discos de nHA y nHA:Eu fueron previamente esterilizados por 10 min con luz UV para todos los experimentos.

2.4 Cultivo celular

Preosteoblastos

Los preosteoblastos murinos MC3T3-E1 Subclona 4 (ATCC CRL-2593) se mantuvieron en crecimiento en medio MEM- α (por sus siglas en inglés, *Minimum Essential Medium Eagle, alpha modification*, Sigma-Aldrich M0894-1L) suplementado al 10% (v/v) de suero fetal bovino (Biowest, U.S.A, S165H-500), 1% (v/v) de aminoácido L-glutamina (Biowest, U.S.A., P1012-100), 1% (v/v) de Antibiótico-Antimicótico 100x, penicilina-estreptomicina (Biowest, U.S.A., L0010-100) y 2 g/L de bicarbonato de sodio. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Fibroblastos

Los fibroblastos murinos L-929 derivados de la cepa L (ATCC CCL-1) se cultivaron en medio DMEM (por sus siglas en inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich D5648-1L) suplementado al 10% (v/v) de suero fetal bovino, 1% (v/v) de aminoácido L-glutamina, 1% (v/v) de antibiótico-antimicótico, penicilina-estreptomicina y 2 g/L de bicarbonato de sodio. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Subcultivo (tripsinización)

Para el mantenimiento de las células cultivadas *in vitro*, es necesario hacer un resembrado en una nueva caja de Petri cuando lleguen a una confluencia de aproximadamente 80%. Para separar las células adheridas a la caja de cultivo celular, es necesario degradar las proteínas de adhesión utilizando una enzima proteolítica denominada tripsina. Para ello, se

retira el medio de cultivo y se lavan las células con la solución salina (PBS) y ésta es retirada, posteriormente se agrega 1 mL de la solución de tripsina y se incuba por 5 min a 37°C y 5% de CO₂. Enseguida se agrega 1 mL de PBS a la caja de Petri y, mediante unos ligeros golpes y pipeteo, se despegan las células. La solución de medio con células en suspensión es posteriormente depositada en un tubo de 15 mL y se afora a 10 mL con medio de cultivo. Después, las células son centrifugadas a 1200 rpm por 5 min, se decanta el medio y las células son suspendidas en 2 mL de medio de cultivo para posteriormente realizar el conteo por el método de exclusión con azul tripano.

Conteo celular por el método de exclusión por azul tripano

Para determinar el número de células en una solución se utiliza el método de exclusión por azul tripano, el cual se basa en la permeabilidad que tienen las células muertas al colorante, por lo que éstas se teñirán de azul, mientras que las células vivas que son impermeables permanecen traslucidas al observarlas al microscopio. Para hacer el teñido se toman 40 µL de azul tripano y 10 µL de células para obtener una disolución 1 en 5. Se toman 10 µL de la disolución, se colocan en una cámara de Neubauer o Hemocitómetro y se realiza el conteo de las células traslúcidas. Posteriormente, se utiliza la siguiente ecuación (Ecuación 1) para determinar el número de células en solución:

$$N_c = \bar{x} * 10,000 * F_d * L$$

En donde N_c es el número de células, \bar{x} es el promedio de células en los cuadrantes de la cámara, F_d es el factor de dilución, en este caso 5 y L es la cantidad en mL de la suspensión, en este caso 2 mL.

Criopreservación de células

Para mantener las células en resguardo se deben colocar en un medio especial de criopreservación y mantenerlas en congelamiento a -80°C o en nitrógeno líquido (-120°C). El medio de criopreservación se compone de 40% de medio de cultivo, 50% de suero fetal bovino y 10% de dimetilsulfóxido, DMSO. Para almacenar las células es necesario contar con al menos 1 millón de células en suspensión, se centrifugan a 1250 rpm por 5 min y se

resuspenden en 1 mL de medio de criopreservación, se almacenan en un vial de criopreservación y se almacenan a -80°C.

2.5 Ensayo de proliferación celular mediante reducción de resazurina

Para determinar la proliferación de los fibroblastos o preosteoblastos cultivados sobre los discos de nHA y NHA:Eu, se realizó un ensayo colorimétrico de proliferación celular por reducción de la resazurina. Los discos previamente esterilizados por luz UV, se colocaron en pocillos de una placa de 96 pozos y se hidrataron con medio MEM- α o DMEM dependiendo de la línea celular. Posteriormente, se colocaron alrededor de 8,000 células en contacto con el andamio y se incubaron por 24, 48, 72 y 96 horas a 37°C y 5% de CO₂. Al finalizar estos periodos de incubación, se agregó resazurina en una proporción 1:10 con el medio de cultivo y se incubó por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. A continuación, se realizó una lectura de 100 μ L del medio de cultivo con la resazurina en un espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 570 y 600 nm.

Para finalizar, se analizaron los datos utilizando las medidas de absorbancia para obtener el porcentaje de resazurina transformada y determinar el crecimiento de la población celular sobre el disco. El porcentaje de reducción se calculó utilizando la ecuación (Ecuación 2):

$$\% \text{ de Reducción} = \frac{((E_{Ox}600 \cdot A_{570}) - (E_{Ox}570 \cdot A_{600}))}{((E_{Red}570 \cdot C_{600}) - ((E_{Red}600 \cdot C_{570}))} \cdot 100$$

En donde:

$E_{Ox}570$ = Coeficiente de extinción molar (ϵ) de la resazurina oxidada a 570 nm = 80,586 M⁻¹ cm⁻¹

$E_{Ox}600$ = ϵ de la Resazurina oxidada a 600 nm = 117,216 M⁻¹ cm⁻¹

A_{570} = Absorbancia del pocillo a 570 nm

A_{600} = Absorbancia del pocillo a 600 nm

$E_{Red}570$ = ϵ de la resazurina reducida a 570 nm = 155,677 M⁻¹ cm⁻¹

$E_{Red}600$ = ϵ de la resazurina reducida a 600 nm = 14,652 M⁻¹ cm⁻¹

C_{570} = Absorbancia del control negativo (medio, resazurina, sin células) a 570 nm

C_{600} = Absorbancia del control negativo (medio, resazurina, sin células) a 600nm

2.6 Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno en preosteoblastos y fibroblastos

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) son subproductos de la respiración celular, éstas juegan un papel importante en el estrés oxidativo de la célula y están relacionadas con el crecimiento y proliferación de las mismas. Para poder cuantificar las ROS generadas en los cultivos celulares, se utilizó el reactivo 5-(6)-carboxi-2',7'-diclorohidrofluoresceína diacetato (carboxy-H₂DCFDA), un marcador fluorogénico para ROS en células vivas. Este reactivo tiene una máxima absorción y emisión a 495/529 nm (Invitrogen, 2004).

Cultivo de las células con las nanopartículas

1. En una placa de cultivo de 24 pozos se agregaron 30,000 células por pozo en un volumen final de 1 mL de medio de cultivo y se incubaron por 24 h a 37°C y 5% de CO₂.
2. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 700 µL de medio de cultivo con una concentración de 4 µg de las nanopartículas por cada 10,000 células, en este caso se agregaron 12 µg de nHA y nHA:Eu. Posteriormente, las células fueron incubadas con las nanopartículas durante 24 y 72 h a 37°C y 5% de CO₂.

Preparación del reactivo Carboxy-H₂DCFDA

Se preparó una solución stock 10 mM del reactivo Carboxy-H₂DCFDA agregando 50 µL de DMSO a 275 µg del reactivo. Posteriormente, el vial se agitó vigorosamente hasta que el polvo estuviera completamente disuelto.

Incubación de las células con el reactivo Carboxy- H₂DCFDA

Para evaluar la cantidad de ROS generadas en las células cultivadas en presencia de los polvos de nHA y nHA:Eu, es necesario separarlas de la caja de cultivo e incubarlas con el reactivo Carboxy-H₂DCFDA, para lo cual se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con 100 μ L de PBS 1x. Se agregaron 100 μ L de tripsina en cada pozo y se incubó la placa por 3 min a 37°C y 5% de CO₂. Las células despegadas del pozo se depositaron en un tubo de 1.5 mL. Se centrifugó el tubo con las células a 1200 rpm por 5 minutos. El pellet obtenido de la centrifugación se resuspendió en 500 μ L de PBS 1x. Se agregó la cantidad necesaria de Carboxy-H₂DCFDA para obtener una concentración final de 25 μ M en cada tubo. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 1 h. Las células se analizaron por citometría de flujo con un citómetro Attune NxT Thermo Fisher con los siguientes parámetros FSC = 625, SSC = 625, BL1 = 250 para las células MC3T3-E1 y FSC = 650, SSC = 650, BL1 = 250 para las células L929. Tomando en consideración 30,000 eventos por lectura y realizando tres lecturas independientes de cada caso. Los datos se graficaron como el número de eventos fluorescentes (positivos) respecto de la fluorescencia de células crecidas en medio de cultivo sin nanopartículas.

2.7 Ensayo de diferenciación celular de preosteoblastos mediante la detección de fosfatasa alcalina

El aumento en la expresión de la fosfatasa alcalina (ALP, por sus siglas en inglés, *alkaline phosphatase*) y su posterior disminución son un marcador temprano y tardío respectivamente, de la diferenciación de los preosteoblastos a osteoblastos y finalmente a osteocitos. Esta diferenciación también es acompañada por un cambio evidente en la morfología del osteoblasto (Bonewald, 2011).

Para determinar la diferenciación inducida por los andamios en los preosteoblastos, se utilizó una prueba colorimétrica para la detección de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina. Para ello, se añadieron alrededor de 5,000 células por pozo en una plaza de 96 pozos. Posteriormente se agregó medio MEM- α suplementado con una concentración de 4 μ g por cada 10,000 células (Liu *et al* 2009) de las nanopartículas de HA y HA:Eu previamente dispersadas. Las células se incubaron por 7 días a 37°C y 5% de CO₂.

Al octavo día de incubación se retiró el medio, se agregó formaldehído al 10% durante 1 minuto para fijar las células, y se lavaron con PBS. En seguida se agregaron 200 μ L del

sustrato BCIP/NBT (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/Azul de nitro tetrazolio) específico para la fosfatasa alcalina y se incubaron por al menos 24 h a 37°C y 5% de CO₂.

La combinación de BCIP y NBT produce un precipitado púrpura intenso cuando reacciona con la fosfatasa alcalina. El color del producto puede ser cuantificado a 550 nm en un espectrofotómetro UV-vis. Para finalizar, se realizó la lectura de los pozos y se utilizaron las medidas de absorbancia para determinar la diferenciación relativa de los preosteoblastos. Además de ello, se tomaron microfotografías para poder correlacionar cualitativamente el cambio morfológico en las células y la presencia de producto derivado de la actividad de la ALP.

2.8 Evaluación de la hemocompatibilidad de los discos de nHA y nHA:Eu.

La evaluación de la biocompatibilidad de los biomateriales permite identificar si la composición química del material y/o subproductos que el material pueda liberar desencadenan una respuesta citotóxica. La Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés, *International Organization for Standardization*) mediante la prueba estándar ISO 10993-4:2007 especifica los requerimientos generales para evaluar las interacciones de aparatos o materiales médicos con la sangre. Esta norma define la hemocompatibilidad como cualquier material o aparato que pueda estar en contacto con la sangre sin presentar una reacción adversa significativa como trombosis, hemólisis o la activación de plaquetas, leucocitos o el complemento (Wallin, 1998). Para la prueba de hemólisis, esta norma dicta que el límite máximo permitido de hemoglobina liberada en comparación con un control positivo de lisis es del 5%. Para evaluar la hemocompatibilidad de los discos se realizó una prueba de hemólisis, como se indica a continuación:

Hidratación de los discos

Los discos de nHA y nHA:Eu se esterilizaron por radiación con luz UV por 10 min y posteriormente se hidrataron con PBS 1x durante 1 hora previa a la prueba de hemólisis.

Preparación de eritrocitos

1. Se obtuvieron 15 mL de sangre periférica de un donador humano normocítico y se colocaron en un tubo BD Vacutainer con EDTA-K2 para prevenir la coagulación. Se agitó suavemente el tubo invirtiéndolo de 8 a 10 veces para asegurar la homogenización del anticoagulante con la muestra de sangre.
2. Se centrifugó la sangre a 3000 rpm por 5 min y se marcó en el tubo el nivel de hematocrito (precipitado rojo, capa inferior) y el plasma (sobrenadante amarillento, capa superior).
3. Se aspiró el plasma con una micropipeta, se inactivó con una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 30 min y se descartó.
4. Al tubo con el hematocrito se le agregó una solución 150 mM de NaCl hasta la marca (nivel original del plasma). Se invirtió el tubo cuidadosamente varias veces para mezclar y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. Finalmente, se aspiró la solución de NaCl.
5. Se agregó PBS 1x hasta llegar a la marca del nivel de plasma original, se invirtió el tubo nuevamente para mezclar, y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. Este paso se repitió 4 veces para lavar las células.
6. Se tomó 1 mL de la solución de eritrocitos y se colocó en 49 mL de PBS 1x para formar una dilución 1:50. Si no se forma un precipitado, entonces las células se lisaron.

Preparación de las muestras

Para las muestras. Los discos hidratados se colocaron en un tubo de 1.5 mL. Se le añadieron 270 μ L de la dilución anterior de eritrocitos (asegurando que la solución fuera homogénea) y se les añadió 30 μ L de medio DMEM.

Para los controles positivos. Se añadieron 270 μ L de los eritrocitos a un tubo de 1.5 mL. Posteriormente, se añadieron 30 μ L de Tritón X-100 al 20% en PBS.

Para los controles negativos. Se añadieron 270 μ L de los eritrocitos a un tubo de 1.5 mL. Posteriormente, se añadieron 30 μ L de PBS 1x.

Posteriormente, los tubos se incubaron por 1 h a 37°C y 5% de CO₂.

Ensayo de hemólisis

1. Los tubos que contenían las muestras, se centrifugaron por 5 min a 3000 rpm para precipitar los eritrocitos. En caso de que se haya inducido la lisis de las células, el sobrenadante de la muestra contendrá la hemoglobina liberada de los eritrocitos.
2. Se agregaron 200 µL del sobrenadante por triplicado a una placa de 96 pozos para su lectura.
3. Se midió la absorbancia de los sobrenadantes con UV-vis en las longitudes de onda 405, 450 y 541 nm en un espectrofotómetro con lector de placa de 96 pozos.

Determinación del porcentaje de hemólisis

Los datos obtenidos se seleccionaron dependiendo si las lecturas se pueden normalizar con respecto a la hemólisis máxima inducida por el control positivo, es decir, si la lectura es menor a 1.0. En este caso, se seleccionaron los datos obtenidos de la absorbancia a una longitud de onda de 541 nm. Para finalizar, se calculó el porcentaje de hemólisis utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Hemólisis} = \left[\frac{A - A_{c-}}{A_{c+}} \right] \cdot 100$$

En donde A es la absorbancia de la muestra, A_{c-} es la absorbancia del control negativo y A_{c+} es la absorbancia del control positivo.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Resultados de la proliferación celular de preosteoblastos MC3T3-E1 cultivados sobre discos de nHA y nHA:Eu

La proliferación de los preosteoblastos cultivados sobre los discos de nHA y NHA:Eu se determinó con un ensayo colorimétrico mediante la reducción del reactivo resazurina al reactivo cromogénico resarufina. Es importante resaltar que la cantidad de resazurina reducida y cuantificada como porcentaje, es un reflejo directo de la actividad metabólica de la célula y, por lo tanto, de la cantidad de células cuantificadas.

En la **Figura 4** se muestra el porcentaje de reducción de la resazurina que corresponde a la proliferación de los osteoblastos murinos MC3T3-E1 cultivados durante 24, 48, 72 y 96 horas sobre los discos de nHA.

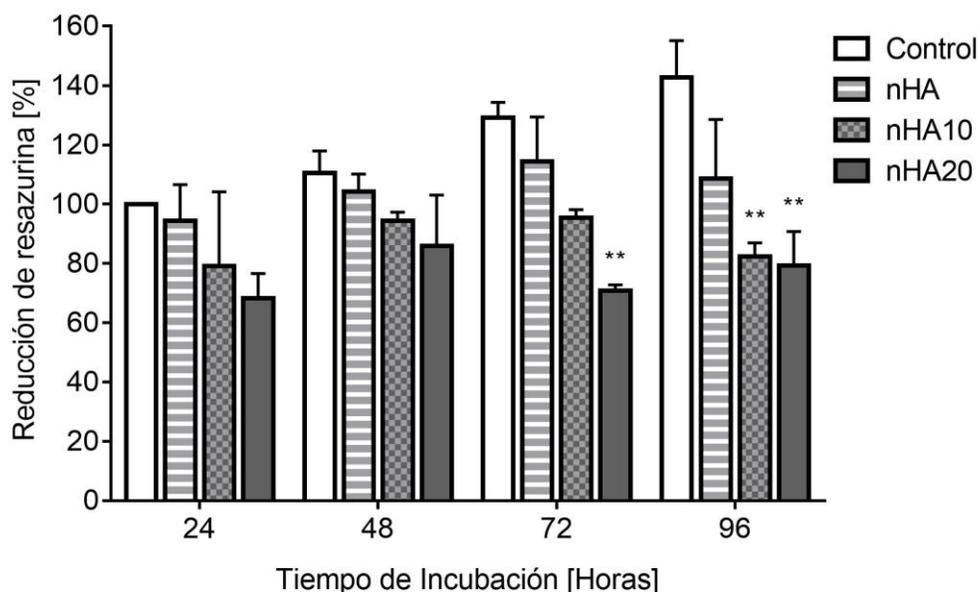


Figura 4. Proliferación de preosteoblastos murinos MC3T3-E1 sobre discos de nHA. Se determinó la proliferación de preosteoblastos MC3T3-E1 cultivados durante 24, 48, 72 y 96 horas sobre discos de nHA. La proliferación celular se determinó por la reducción de la resazurina, cada experimento fue comparado con el control de células creciendo en condiciones normales de cultivo. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías con el software GraphPad Prism 7; en dónde, ** $p < 0.01$ es diferente significativamente respecto al control de la medición.

En la Figura 4 se observa el porcentaje de la reducción de la resazurina correspondiente a la población celular que creció en cada material y en el control (preosteoblastos cultivados únicamente con medio) para los diferentes tiempos de incubación: 24, 48, 72 y 96 horas, respectivamente. Cabe destacar que la población celular del control a 24 h de incubación fue establecida como 100% para comparar la población celular de los materiales.

Es notorio que existe una tendencia en el incremento en la media de la población celular de preosteoblastos cuando son cultivados sobre el disco de nHA y que estadísticamente es similar a la del control. De la misma forma, existe un incremento en la población de los preosteoblastos que han crecido sobre el disco de nHA10 por 24, 48 y 72 horas, sin embargo, a las 96 h el crecimiento es mucho menor que en el control. Mientras que, el crecimiento en la población celular presente en los discos de nHA20, no tiene una tendencia al incremento, sin embargo, esta disminución no es estadísticamente significativa, exceptuando en los valores obtenidos a las 72 y 96 h, en donde el crecimiento de los preosteoblastos cultivados en el disco nHA20 es significativamente menor que en el control.

Por otro lado, en la **Figura 5** se expone el porcentaje de reducción de la resazurina generado por la proliferación celular de los preosteoblastos cultivados sobre los discos de nHA:Eu durante 24, 48, 72 y 96 horas de incubación.

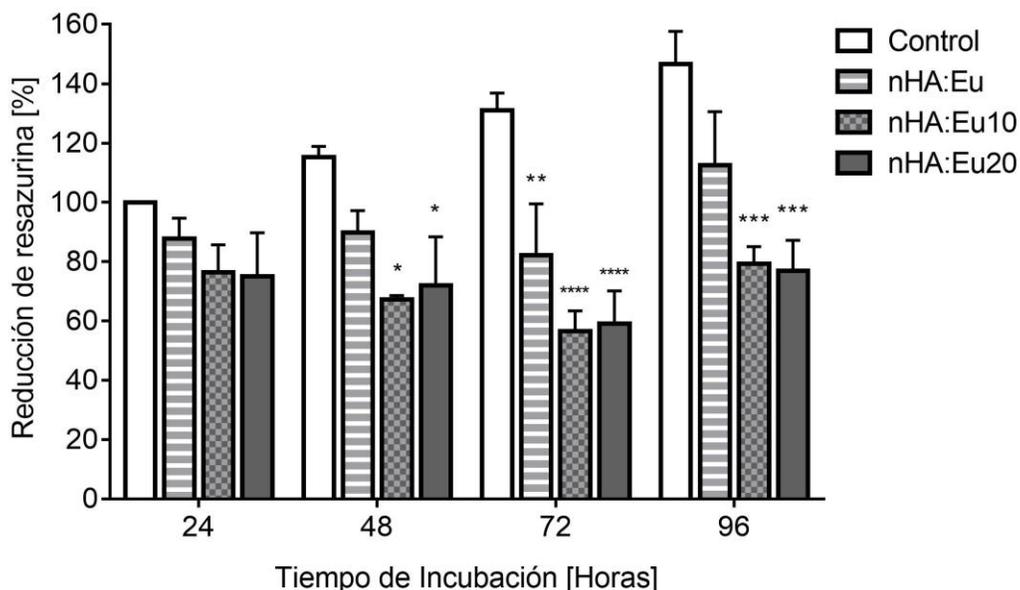


Figura 5. Proliferación celular de preosteoblastos murinos MC3T3-E1 sobre discos de nHA:Eu. Se determinó la proliferación de preosteoblastos MC3T3-E1 durante 24, 48, 72 y 96 horas sobre discos de nHA:Eu. La proliferación celular se determinó por la reducción de la resazurina, cada experimento fue comparado el control de células creciendo en condiciones normales de cultivo por 24 horas. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías con el software GraphPad Prism 7; en dónde, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y **** < 0.0001 es diferente significativamente respecto al control de la medición.

En la Figura 5, es posible notar que existe una tendencia en el incremento del porcentaje de reducción de la resazurina y por lo tanto, en la media de la población de preosteoblastos que se encuentran sobre el disco de nHA:Eu en todos los tiempos de incubación. Sin embargo, analizando los resultados del porcentaje de reducción de la resazurina generada por las células cultivadas sobre los discos de nHA:Eu10 y nHA:Eu20, se observa que solamente durante las primeras 24 h de cultivo celular, la población de preosteoblastos, fue similar a la del control, pero existe un cambio significativo de la población celular que disminuyó después de las 48 h y se mantuvo por debajo del control hasta las 96 h.

3.2 Resultados de la proliferación celular de fibroblastos L929 cultivados sobre discos de nHA y nHA:Eu

En la **Figura 6** se presenta el porcentaje de la reducción de resazurina generada por la proliferación de los fibroblastos murinos L929 cultivados durante 24, 48, 72 y 96 h sobre los discos de nHA.

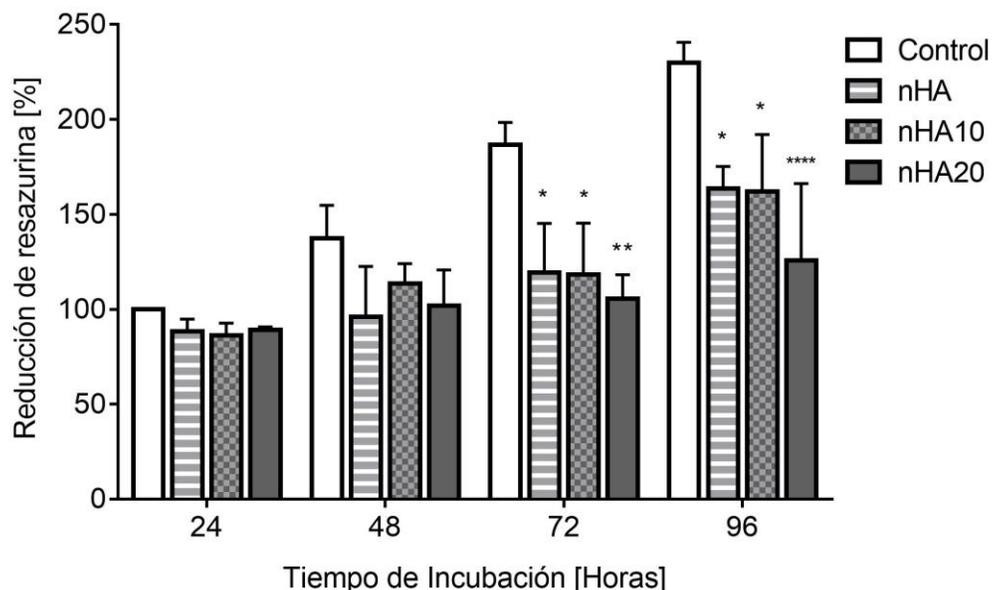


Figura 6. Proliferación de fibroblastos murinos L929 sobre discos de nHA. Se determinó la proliferación de fibroblastos L929 cultivados durante 24, 48, 72 y 96 horas sobre discos de nHA. La proliferación celular se determinó por la reducción de la resazurina, cada experimento fue comparado el control de células creciendo en condiciones normales de cultivo por 24 horas. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías con el software GraphPad Prism 7; en dónde, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y **** < 0.0001 es diferente significativamente respecto al control de la medición.

La Figura 6 muestra una tendencia de crecimiento en la media poblacional de los fibroblastos cultivados en todos los materiales evaluados respecto del control. Sin embargo, este aumento fue significativo hasta las 72 h de cultivo (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$) para todos los casos, ya que es posible observar una diferencia significativa en la población celular con respecto al control a las 72 h de cultivo, la cual permanece a las 96 h. Por otro lado, es importante mencionar que no existe diferencia significativa entre las poblaciones de

fibroblastos que crecieron sobre los tres discos: nHA, nHA10 y nHA20, pero si existe una diferencia significativa entre estas poblaciones celulares y aquella que creció en el control, siendo ésta mayor que las que crecieron sobre los discos.

Por otra parte, en la **Figura 7** se presentan los resultados del porcentaje de reducción de la resazurina generada por la proliferación de los fibroblastos crecidos sobre discos de nHA:Eu durante 24, 48, 72 y 96 horas.

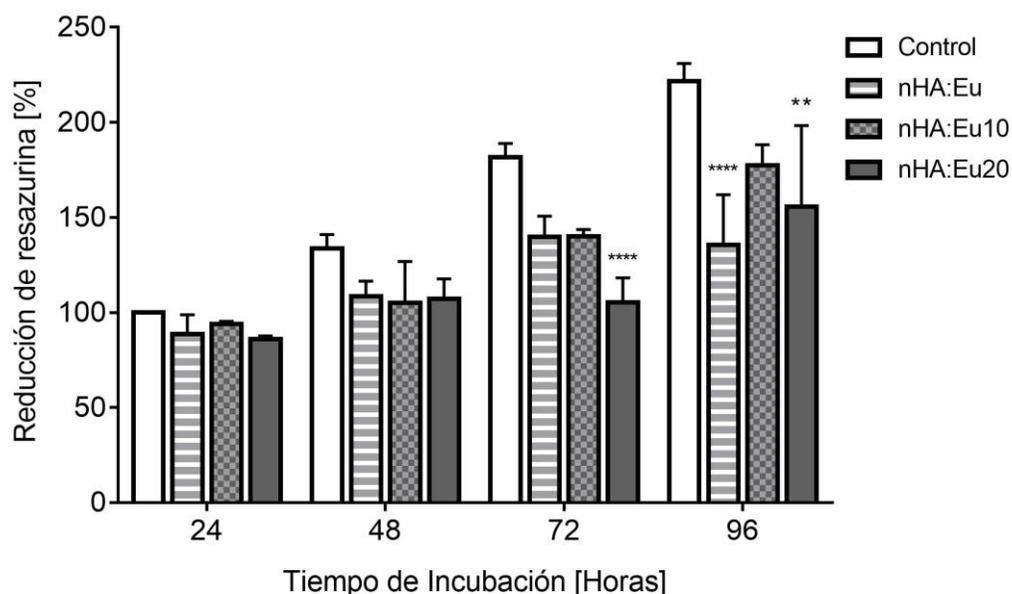


Figura 7. Proliferación de fibroblastos murinos L929 sobre discos de nHA:Eu. Se determinó la proliferación de fibroblastos L929 cultivados durante 24, 48, 72 y 96 horas sobre discos de nHA:Eu. La proliferación celular se determinó por la reducción de la resazurina, cada experimento fue comparado el control de células creciendo en condiciones normales de cultivo por 24 horas. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía con el software GraphPad Prism 7; en dónde, ** $p < 0.05$ y **** < 0.0001 es diferente significativamente respecto al control de la medición.

Los datos graficados en la Figura 7, muestran que existe una tendencia de crecimiento en la media poblacional de los fibroblastos cultivados sobre los discos de nHA:Eu, la cual es muy similar a la obtenida con los fibroblastos cultivados sobre los discos de nHA sin dopar. Para el caso de los discos de nHA:Eu y nHA:Eu10, con el paso del tiempo, se observa un incremento en la población celular sin embargo siempre estuvo por debajo del crecimiento

poblacional de las células control. Para el caso de las células que crecieron sobre los discos de nHA:Eu20, se observa una inhibición significativa de crecimiento en las células cultivadas a las 72 h.

Los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación de los fibroblastos crecidos sobre los discos de nHA y nHA:Eu revelaron que existe una tendencia del crecimiento celular similar entre todos los materiales, pero que resulta ser menor que el crecimiento de las células en el control. Además, se obtuvo que no existe diferencia significativa en las poblaciones crecidas en los tres discos: sin y con tratamiento térmico.

3.3 Determinación del estrés oxidativo inducido en preosteoblastos MC3T3 incubados con nHA y nHA:Eu

Se midió la cantidad de ROS generadas intracelularmente mediante la cuantificación de la fluorescencia de los preosteoblastos después de haber sido cultivados por 24 y 72 h con las nanopartículas de HA y HA:Eu con y sin tratamiento térmico. Se decidió realizar las evaluaciones a las 24 h debido a que es durante este tiempo que la célula puede adherirse a la superficie de la placa y comenzar su proceso de división; mientras que a las 72 h el crecimiento en la población de los osteoblastos cultivados sobre los discos de nHA y nHA:Eu comenzó a decaer de forma estadísticamente significativa.

La producción de ROS se determinó tomando como referencia los eventos fluorescentes del control negativo, que son células en medio de cultivo que han crecido durante el mismo periodo de incubación. La **Figura 8** muestra los resultados de la medición de la generación de ROS en los preosteoblastos cultivados en presencia de nHA y nHA:Eu.

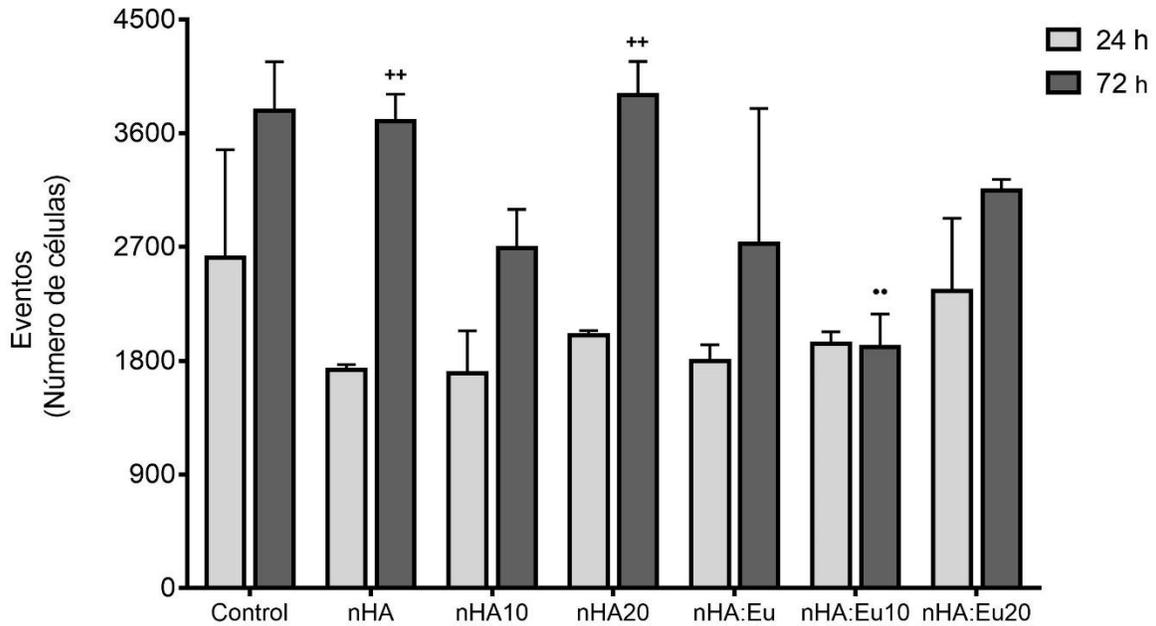


Figura 8. Cuantificación de las células que presentan estrés oxidativo del cultivo de preosteoblastos murinos MC3T3-E1 al ser incubados en presencia de las nanopartículas de HA y HA:Eu. Se cuantificaron las células que presentaron fluorescencia, es decir, generación de ROS derivadas del cultivo por 24 y 72 h con una concentración de 4 ug nHA y nHA:Eu por cada 10,000 células. Se consideró como control el número de células que presentaron fluorescencia intrínseca proveniente del cultivo en condiciones normales. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías con el software GraphPad Prism 7; en dónde, ** $p < 0.01$ es diferente significativamente al control respectivo y ++ < 0.01 es diferente significativamente respecto a la misma muestra a 24 h.

Los resultados anteriores indican que, en comparación con la generación de ROS intrínsecas en condiciones normales, los preosteoblastos cultivados por 24 h en presencia de los nanomateriales, presentan niveles de generación de ROS iguales a los del control. Por otra parte, existe un aumento en los eventos de fluorescencia a las 72 h, sin embargo, este aumento es solo significativo para las células expuestas a nHA y nHA20 y que coincide con la disminución de la población celular en los ensayos de proliferación.

3.4 Determinación del estrés oxidativo en fibroblastos L929

Al igual que en el experimento anterior, se midió la cantidad de eventos de fluorescencia y por lo tanto, la cantidad de ROS producidas por los fibroblastos L929 después de ser cultivados por 24 y 72 h en presencia de las nanopartículas de HA y HA:Eu. La **Figura 9** muestra los resultados de la medición de la generación de ROS en los fibroblastos cultivados en presencia de nHA y nHA:Eu.

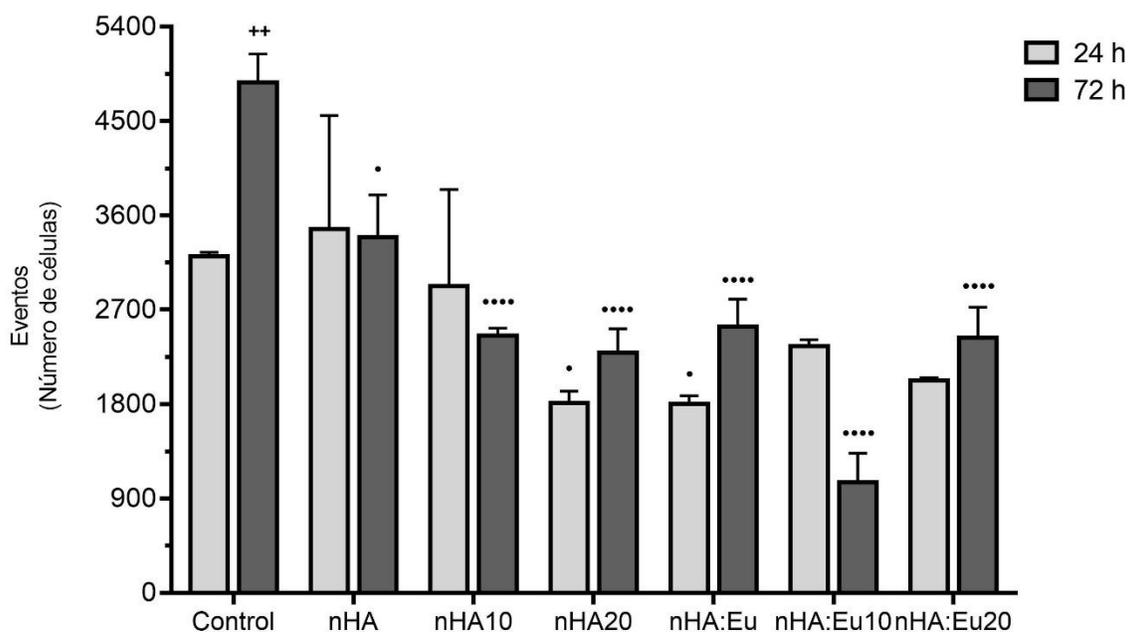


Figura 9. Cuantificación de células que presentan fluorescencia del cultivo de fibroblastos murinos L929 incubados por 24 y 72 horas en presencia de las nanopartículas de HA y HA:Eu. Se consideró el número de eventos fluorescentes de las células crecidas en medio de cultivo como referencia (Control) y de esta forma se comparó con el número de células que emitían fluorescencia al ser cultivadas con los nanomateriales. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías con el software GraphPad Prism 7; en donde, • $p < 0.05$ y •••• < 0.0001 es diferente significativamente respecto a su control y •• < 0.01 es diferente significativamente respecto a la misma muestra a 24 h.

La Figura 9 muestra los resultados de la medición de fluorescencia dado por la generación de ROS intracelulares. Los resultados muestran que a las 24 h existe una producción de ROS

por los fibroblastos expuestos a las nanopartículas de la misma proporción que el control. Mientras que a las 72 h existe una disminución significativa de las ROS intracelulares pero que es estadísticamente similar a los eventos registrados a las 24 h de cultivo para todos los materiales.

3.5 Ensayo de diferenciación de preosteoblastos murinos en presencia de nHA y nHA:Eu

El ensayo colorimétrico para la determinación de la presencia de ALP, muestra un precipitado color violeta con un pico de absorbancia a 550 nm que indica la cantidad de producto generado por enzima en las células. En la **Figura 10**, se muestra la cantidad relativa de ALP en los preosteoblastos después de haber sido cultivados con una concentración de 4 μg por cada 10,000 células de la nHA y nHA:Eu.

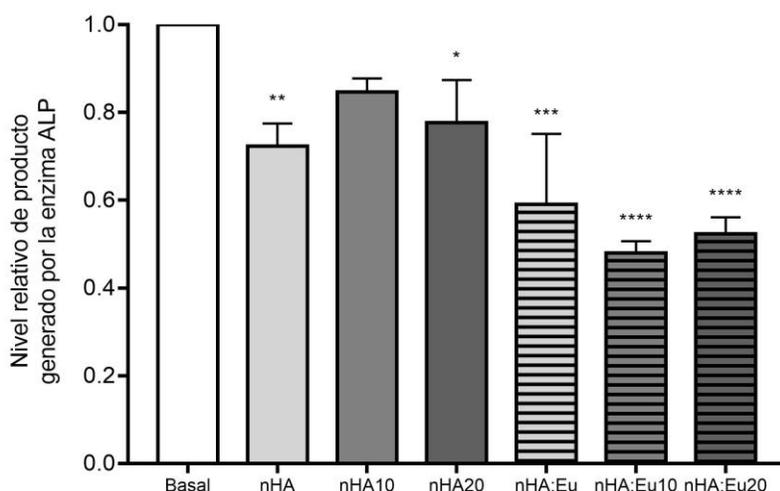


Figura 10. Cuantificación de la cantidad de fosfatasa alcalina para determinar la diferenciación de preosteoblastos murinos MC3T3-E1. Se determinaron los niveles relativos del producto generado por la enzima fosfatasa alcalina (ALP) de los preosteoblastos al ser cultivados por 7 días con una concentración de 4 μg de nHA y nHA:Eu por cada 10,000 células. Se tomó el nivel de producto generado por la ALP de las células control crecidas en medio de cultivo como referencia. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía con el software GraphPad Prism 7; en dónde, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ es diferente significativamente respecto al nivel basal.

En la Figura 10, se observa que existe una disminución de la presencia del producto de la enzima ALP con respecto al control en las células expuestas a todos los materiales. Sin embargo, existe una disminución mayor en las células expuestas a la nHA:Eu con 10 y 20 horas de tratamiento térmico.

Este decremento en el precipitado de color violeta es un indicador cualitativo de la presencia de ALP, como se puede observar en las micrografías mostradas en la **Figura 11**.

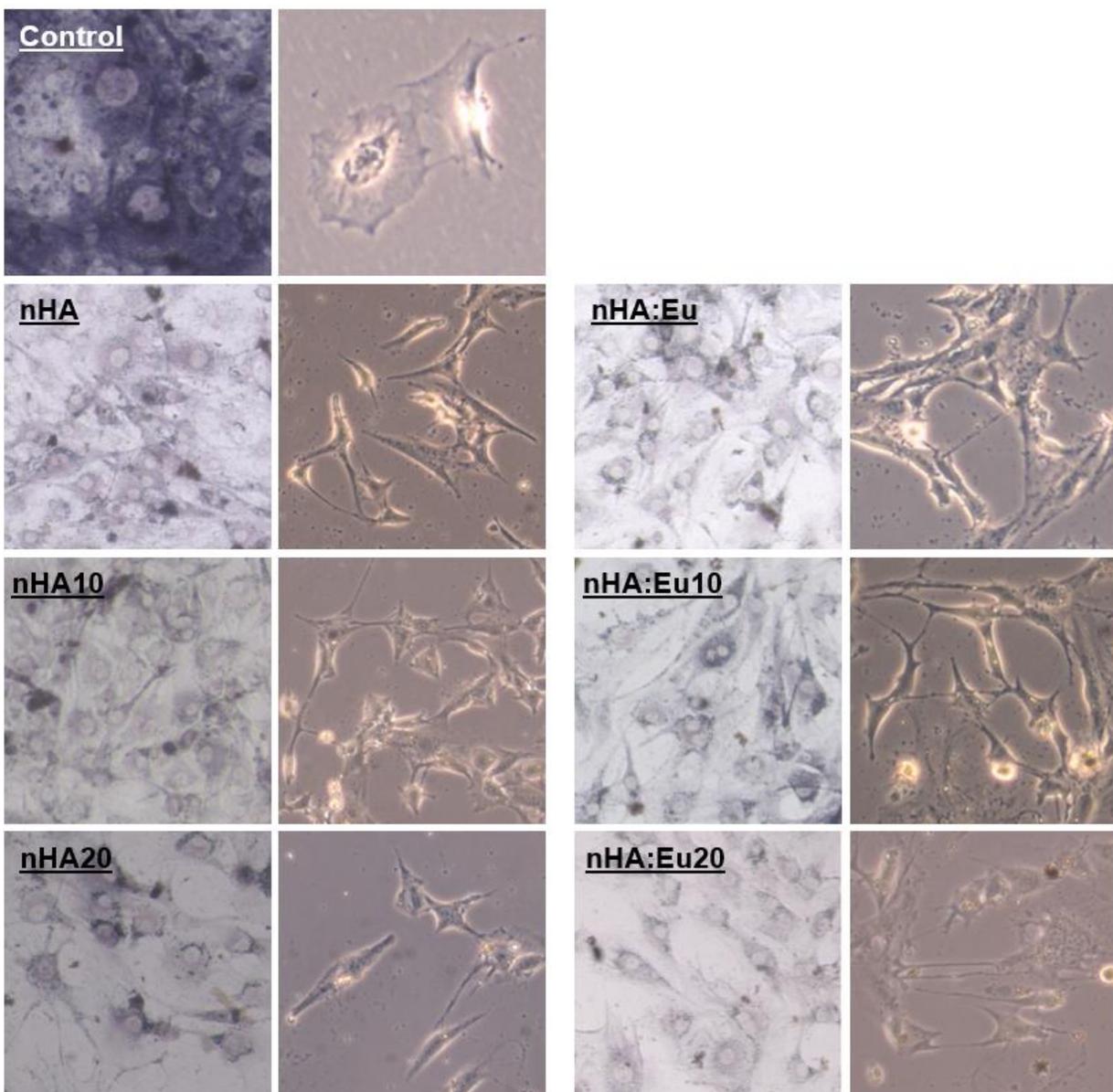


Figura 11. Micrografías del proceso de diferenciación de los preosteoblastos. Se observa un decremento del precipitado violeta en las células expuestas a todos los materiales (izquierda) además de un cambio en la morfología de la célula (derecha). La disminución del precipitado en el exterior de la célula indica una disminución de la enzima ALP. Las células del control se observan redondas y extensas mientras que las expuestas a las nanopartículas se observan con extensiones dendríticas y alargadas.

En las micrografías de la Figura 11, se observa la disminución del precipitado violeta en las células expuestas a las nanopartículas, respecto del control, que son los preosteoblastos cultivados únicamente en medio de cultivo, en donde la presencia del precipitado violeta producto de la actividad de la ALP es evidente. Por otro lado y no menos importante, la disminución cualitativa de la actividad de la ALP en los preosteoblastos incubados con nHA y nHA:Eu, se correlaciona con un cambio en la morfología de los osteoblastos. Como se puede observar, las células control con elevada presencia de ALP son células más redondeadas mientras que los osteoblastos que están en proceso de diferenciación son más alargados y con estructuras fibrilares, lo cual es un indicador cualitativo del proceso de diferenciación de los osteoblastos hacia osteocitos.

3.6 Ensayo de hemólisis

El ensayo de hemólisis evalúa la hemoglobina liberada como un indicador de la lisis de los eritrocitos (glóbulos rojos). La cantidad de hemoglobina liberada se determinó después de que los eritrocitos estuvieran en contacto con los discos de nHA y nHA:Eu, su cuantificación se realizó respecto del control positivo, que es la hemoglobina liberada de los eritrocitos por acción del detergente Triton X-100 al 20%, el cual puede romper completamente la membrana de los eritrocitos y provocar su hemólisis.

En la **Figura 12** se presentan los porcentajes de hemólisis generados por la incubación de los eritrocitos con cada uno de los 6 discos de nHA, los resultados se comparan con el control positivo de hemólisis.

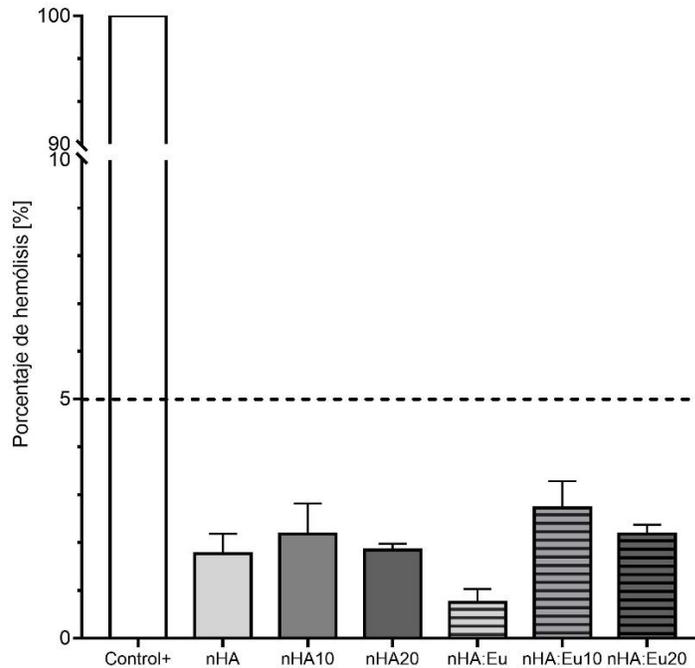


Figura12. Porcentaje de hemólisis generado en los eritrocitos por la incubación con los discos de nHA y nHA:Eu. Se determinó la cantidad de hemoglobina liberada por los eritrocitos al estar en contacto con los discos de nHA y nHA:Eu. La línea punteada representa el límite máximo de hemólisis permitido por la ISO 10993-4:2002 que es del 5%. Los 6 materiales presentaron un porcentaje inferior al máximo permitido.

Los resultados muestran que el porcentaje de hemólisis de todos los discos de nHA y nHA:Eu, es menor al límite permitido por la ISO 10993-4:2002 que es del 5%. Por lo tanto, no existió toxicidad directa de los discos y pueden ser considerados hemocompatibles.

Capítulo 4. Discusión

En este trabajo se evaluaron diferentes interacciones biológicas de 6 tipos de nanopartículas de hidroxiapatita. Con la finalidad de evaluar la biocompatibilidad de estas nanopartículas en preosteoblastos y fibroblastos, se realizaron ensayos de proliferación, cuantificación de especies reactivas de oxígeno y evaluación de la liberación de hemoglobina, además de determinar el proceso de diferenciación de los osteoblastos inducido por las nanopartículas mediante la detección de la enzima fosfatasa alcalina.

4.1 Ensayo de proliferación celular

Una amplia gama de funciones celulares normales, incluida la migración, la proliferación y los procesos de diferenciación están estrechamente relacionados al proceso de adhesión celular. Como la adhesión celular es mediada a través de la unión de las integrinas a las proteínas de la matriz extracelular como el colágeno, fibronectina y vitronectina, entre otras, esta interacción depende de la densidad, conformación y el tipo de proteínas adsorbidas, así como la rugosidad de la superficie del biomaterial subyacente y la concentración de iones en el ambiente acuoso (Samavedi *et al* 2013).

Diversos estudios han demostrado que la cristalinidad y solubilidad de los fosfatos de calcio pueden afectar la adhesión celular al influir en la concentración de proteínas adsorbidas, así como al pH y la concentración de iones en el medio. Por ejemplo, Hu y colaboradores (2007) mostraron que células madre mesenquimales de conejo se adhirieron mejor sobre nHA que sobre nACP (nanopartículas de fosfato de calcio amorfo).

De igual manera Berube y colaboradores (2005) demostraron que osteoblastos calvariales murinos se adhirieron mejor en superficies de HA con mayor cristalinidad que en superficies de HA con menor cristalinidad o en varias superficies de ACP.

John y colaboradores (2003) mostraron que un cultivo de células tipo osteoblasto MG-63 se adherían y proliferaban en superficies menos solubles como HA, mientras que mostraban menor adhesión en superficies solubles como el β -TCP (fosfato tricálcico beta) en etapas

tempranas de la incubación (24 h). Sin embargo, se observó que ambas superficies inhiben la diseminación celular y el crecimiento en etapas tardías de incubación (144 h). Los autores sugieren que la poca adhesión y diseminación celular en las superficies de β -TCP se debe a la rápida liberación de iones fosfato y la re-precipitación de apatita en las superficies. En contraste, las superficies de HA promovieron la adhesión celular en etapas tempranas debido a su liberación iónica y tasa de recristalización relativamente lenta.

Se sugiere que las especies liberadas desde la superficie pueden causar cambios drásticos en el pH local, lo cual afecta la adsorción de proteínas a la superficie y afecta las respuestas celulares posteriores hacia el material. Por último, sugieren que el filtrado continuo de iones fosfato y calcio desde la superficie, y la formación de una película de apatita pueden prevenir la disponibilidad de la fibronectina u otras proteínas de adhesión celular.

Los resultados del ensayo de proliferación muestran que la proliferación de los preosteoblastos murinos MC3T3-E1 se vio inhibida sobre los discos de nHA y nHA:Eu tratados térmicamente a las 72 h de cultivo. De manera similar, la proliferación de los fibroblastos L929 se vio inhibida por las tres superficies a las 72 h, pero en menor magnitud comparada con las células MC3T3-E1. Se ha observado experimentalmente que al tratar térmicamente las nanopartículas de HA, estas presentan una fase de TCP (Ver **Anexo I**). Al aumentar esta fase, aumenta la solubilidad del disco conformado con estas nanopartículas. La disminución en la población celular a las 72 h producida por los discos de nHA Y nHA:Eu podría seguir el mecanismo de liberación de iones hacia el medio propuesto por John y colaboradores. En este sentido, es posible que los discos conformados con nHA sometidas a tratamiento térmico, al contener un mayor porcentaje de la fase de TCP, sean más solubles que la nHA y nHA:Eu sin este tratamiento térmico. Por lo cual, la liberación de iones al medio sería mayor, y por lo tanto, se explicaría la capacidad que tienen para disminuir la proliferación celular de preosteoblastos y fibroblastos.

4.2 Producción intracelular de especies reactivas de oxígeno en células cultivadas en nHA y nHA:Eu.

La producción regulada de las especies reactivas de oxígeno (ROS), determina distintas funciones celulares como la proliferación, diferenciación, supervivencia o muerte celular, mientras que, niveles desregulados de estas especies pueden considerarse dañinas debido al estrés oxidativo que producen (Atashi *et al* 2013). De esta forma, el aumento en la población celular va acompañado de la producción regulada ROS, además, recientemente se ha reportado que las ROS intracelulares participan como mediadores en la diferenciación de osteoblastos murinos (Arakaki *et al* 2013) mediante la inducción de la ALP mediada por la activación de la NADPH oxidasa (Mandal *et al* 2011).

En este trabajo, se cuantificaron los eventos de fluorescencia celular para determinar si las nanopartículas generan un aumento en los niveles de ROS en preosteoblastos y fibroblastos y determinar así si existe una inducción del estrés oxidativo mediada por la exposición a las nHA y nHA:Eu.

Los resultados demostraron que después de que las dos líneas celulares estuvieron en contacto con las nanopartículas por 24 h, ambas mostraron una cantidad de ROS estadísticamente similar al de las células control, que en este caso serían consideradas como las ROS generadas de forma intrínseca por las células creciendo en condiciones normales. Por lo que se puede decir que, a 24 h, las nanopartículas no producen un aumento de ROS intracelular y, por lo tanto, no inducen estrés oxidativo.

Por otra parte, la cuantificación de la generación de ROS intracelulares a las 72 h de exposición a los nanomateriales arrojó que la cantidad de eventos fue estadísticamente similar para los preosteoblastos y los fibroblastos, por lo tanto, la cantidad de ROS inducida en las células expuestas los nanomateriales por 24 y 72 h era la misma. Esto puede explicarse debido a que el crecimiento de las células sobre los discos de nHA fue mucho menor que en el control y, por lo tanto, la cantidad de ROS generada también lo es. Sin embargo, es posible notar un ligero aumento en la media de los eventos registrados del cultivo de osteoblastos. Arakaki y colaboradores (2013) muestran que la producción de ROS

se vio incrementada en osteoblastos MC3T3-E1 después de una inducción osteogénica mediante la activación de la NADPH oxidasa. Por lo cual, este aumento puede estar relacionado con el inicio del proceso de diferenciación.

Algunos estudios recientes demuestran que las nanopartículas de hidroxiapatita, especialmente las esféricas no producen estrés oxidativo en diferentes líneas celulares sometidas hasta con el doble de la concentración utilizada para este trabajo que fue de 51.42 ug/mL, es decir 100 ug/mL (Zhao 2013 y Remya 2014).

4.3 Diferenciación osteoblástica

Una característica interesante de los fosfatos de calcio (CaPs) es su capacidad de inducir la diferenciación osteoblástica, este proceso parece estar influenciado por la liberación de iones de la superficie de éstos. Los iones Ca^{2+} liberados desde las superficies de los CaPs parecen jugar un papel importante en la diferenciación osteoblástica. Jung y colaboradores (2010) sugieren que el calcio extracelular obtenido de una pequeña disolución de HA, podría internalizarse a través de los canales iónicos y activar la ruta de diferenciación CaMK2 α /CAM. Por otra parte, el fosfato también juega un papel en la diferenciación osteoblástica. Beck y colaboradores (2000) mostraron la inducción específica de la osteopontina (marcador proteico de diferenciación) en células MC3T3-E1 en respuesta directa al aumento de los niveles de fosfato.

El proceso de diferenciación de los osteoblastos está caracterizado por la proliferación celular, maduración de la matriz extra celular y su posterior mineralización. La fase de maduración celular *in vitro* está caracterizada por la máxima expresión de la fosfatasa alcalina (ALP) (Promocell 2018) y su posterior disminución cuando el osteoblasto pasa a un fenotipo de osteocito. Además, el proceso de diferenciación se encuentra acompañado de un cambio en la morfología del osteoblasto: de una morfología poligonal estrellada a una célula fibrilar con extensiones dendríticas (Bonewald 2011).

Los resultados de este trabajo en relación a la evaluación de la diferenciación celular, demostraron que las células expuestas a las nanopartículas durante 7 días presentan una disminución en el precipitado de color violeta, el cual es el producto de la reacción

enzimática de la enzima ALP, por lo tanto, se correlaciona con una disminución en la cantidad de esta enzima. Por otra parte, después de la exposición de los preosteoblastos a los nanomateriales estudiados en este trabajo, fue posible observar un cambio en la morfología de las células; las cuales presentaban una morfología fibrilar y extensiones dendríticas, muy parecidas a aquellas que se reconocen como cambios típicos en el proceso de diferenciación de osteoblasto a osteocito.

Cabe mencionar que estos ensayos demuestran cambios cualitativos del proceso de diferenciación y por lo tanto, para complementarlos, es necesaria la cuantificación y comparación del nivel de los transcritos de los genes involucrados en el proceso de diferenciación. Algunos de estos marcadores pueden ser la misma fosfatasa alcalina –para confirmar su disminución-, osteocalcina (producida por el osteoblasto tardío y el osteocito) y esclerostina (marcador del osteocito maduro) (Bonewald 2017).

4.4 Evaluación de la hemocompatibilidad

La norma ISO 10993-1, es una guía internacional para los ensayos de biocompatibilidad de dispositivos médicos. Esta norma solicita la evaluación de la hemocompatibilidad para cualquier dispositivo que tenga contacto con la sangre directa o indirectamente. Debido a que la nHA y nHA:Eu son nanomateriales que podrían ser utilizados como componentes de un andamio celular, y éste pudiera estar en contacto con la sangre, es importante que la hemocompatibilidad de éstas nanopartículas sea evaluada. Además, con la reciente incorporación de nanopartículas para terapia o diagnóstico, cada vez es más común realizar ensayos para determinar la interacción de las nanopartículas con los componentes sanguíneos (Evani y Ramasubramanian 2011).

Se ha elegido el ensayo de liberación de hemoglobina debido a que los eritrocitos componen alrededor del 45% del volumen sanguíneo. Son considerados como osmómetros perfectos ya que cualquier perturbación osmótica, cambios en el pH o cambios físicos en la sangre pueden causar su ruptura (Dourmashklin y Rosse 1966). Los resultados de la prueba de lisis de eritrocitos que se obtuvieron para los 6 discos de nHA y nHA:Eu y mostraron un porcentaje de hemólisis menor al 5%. Este porcentaje sugiere que los discos de

nanopartículas no generan cambios físicos en el medio que puedan causar la lisis de los eritrocitos al ser incubados durante 1h. Por lo tanto, con base en la guía ISO 10993-4 se pueden considerar a los discos como hemocompatibles.

Capítulo 4. Conclusiones

En este trabajo se evaluó la biocompatibilidad de nanopartículas HA y nanopartículas de HA:Eu. Se realizaron 4 pruebas: a) Proliferación sobre discos conformados de las nanopartículas, b) Cuantificación de ROS en las células expuestas a soluciones de las nanopartículas, c) Evaluación cualitativa del proceso de diferenciación osteoblástica inducida y d) Determinación de la hemocompatibilidad de los discos conformados.

Los estudios de proliferación demostraron que todos los discos conformados con las nanopartículas disminuyeron la tasa de proliferación celular. Se observó un cambio significativo hasta las 72 h en comparación con el control. Sin embargo, una característica notable es que los discos no producen muerte celular.

La cuantificación de ROS sugiere que las nanopartículas no inducen el aumento de ROS intracelular y, por lo tanto, no generan estrés oxidativo a bajas concentraciones.

La expresión cualitativa de la ALP se vio reducida significativamente a los 7 días de la exposición a las nanopartículas de HA y HA:Eu, además de observarse un cambio en la morfología de los osteoblastos; por lo que es posible determinar de forma cualitativa que éstas inducen el proceso de diferenciación osteoblástica.

Los hemolisis producida por los discos conformados con las nanopartículas fue menor del 5% para todos los casos de acuerdo a la prueba estándar ISO 10993-4. Por lo que según esta norma pueden ser considerados como hemocompatibles.

Debido a los resultados obtenidos sobre la biocompatibilidad de las nanopartículas, estas pueden ser consideradas útiles en la ingeniería de tejido óseo, especialmente en combinación con otros agentes para formar un biocemento o un andamio celular. Los resultados sugieren que éstos materiales no promueven la proliferación celular, sin embargo, no son citotóxicos y promueven la diferenciación osteoblástica.

Es por esto que en combinación con algún agente promotor de proliferación podría servir como un compuesto osteoconductor y osteoinductor.

Literatura citada

Braddock M, Houston P, Campbell C, Ashcroft P. 2001. Born again bone; tissue engineering for bone repair. *News Physiol. Sci.* 16, 208 – 213.

Goldberg V, Stevenson S. 1987 Natural history of autografts and allografts. *Clin. Orthop.* 225 7–16.

Costantino P y Friedman C. 1994. Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 27 1037–74.

Langer R y Vacanti J. P. 1993. Tissue engineering. *Science*, vol. 260, no. 5110 920–926.

Skalak R y Fox C. F. (Eds.). 1991. *Tissue Engineering* (Liss, New York, 1988); R. M. Nerem, *Ann. Biomed. Eng.* 19 529.

Grand View Research. 2018. Tissue engineering market size, share and trends analysis report by application (cord blood and cell banking, cancer, GI and gynecology, dental, skin/intergumentary, orthopedics), and segment forecasts, 2012 – 2022.

Langer R. and Tirrell D.A. 2004. Designing materials for biology and medicine, *Nature*, vol. 428, no. 6982, 487–492.

LeGeros R. 2002. Properties of osteoconductive biomaterials: calciumphosphates. *Clin. Orthop.* 395 81–98.

Dorozhkin S. 2009. Calcium orthophosphates in nature, *Biol. Med. Mater.* 2 399–498.

Skinner H. 2005. Biominerals. *Minerals Magazine* 69 621–641.

Hughes J. M and Rakovan J. 2002. The crystal structure of apatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{OH}, \text{Cl})$, in *Phosphates: Geochemical, Geobiological and Material Importance*, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, vol. 48, Mineralogical Society of America, Washington, DC 1–12.

Šupová, Monika. 2015. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceramics International*. 41. 10.1016/j.ceramint.2015.03.316.

Sadat-Shojai M. 2010. Hydroxyapatite: inorganic nanoparticles of bone (properties, applications, and preparation methodologies). Tehran: Iranian Students Book Agency (ISBA); (in Persian).

Vallet-Regí, M. Gonzalez-Calbet, J. M. 2004. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog. Solid State Chem.* 32, 1–31.

Cai Y, Liu Y, Yan W, Hu Q, Tao J, Zhang M, et al. 2007. Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation. *J Mater Chem*; 17:3780–7.

Dobrovolskaia, M. A., P. Aggarwal, J. B. Hall et al. 2008. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol. Pharm.* 5 (4):487–495

Evani S, Ramasubramanian A, Sithamaran B (Ed). 2011. *Nanomaterials Handbook*. FL USA: CRC Press.

Vallet-Regí M. 1997. Introduction to the world of biomaterials. *Ann Quim Int Ed*; 93:S6–S14

De Araujo, T. S.; Macedo, Z. S.; De Oliveira, P. A. S. C.; Valerio, M. E. G. 2007. Production, characterization of pure, and Cr³⁺-doped hydroxyapatite for biomedical applications as fluorescent probes. *J. Mater. Sci.*, 42, 2236–2243.

Jagannathan, R.; Kottaisamy, M. 1995. Eu³⁺ luminescence: a spectral probe in M₅(PO₄)₃X apatites (M = Ca or Sr; X = F⁻, Cl⁻, Br⁻ or OH⁻). *J. Phys.: Condens. Matter*, 7, 8453–8466.

Malmberg, P.; Nygren, H. 2008. Methods for the analysis of the composition of bone tissue, with a focus on imaging mass spectrometry (TOF-SIMS). *Proteomics*, 8, 3755–3762.

Nelson B.C., Johnson M.E., Walker M.L., Riley K.R., Sims C.M. 2016. Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine. *Antioxidants (Basel)*. May 17; 5(2).

Lee S.S., Song W., Cho M., Puppala H.L., Nguyen P., Zhu H., Segatori L., Colvin V.L. 2013 *ACS Nano*; 7(11): 9693-703.

Aoki H. 1994. *Medical applications of hydroxyapatite*. Tokyo, St. Louis: Ishikayu Euro America Inc.

- Dong Z, Li Y, Zou Q. 2009. Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering. *Appl Surf Sci*; 255: 6087–91.
- Dorozhkin SV. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. 2010. *Acta Biomater*; 6:715–34.
- Sadat-Shojai, M.; Khorasani, M.-T.; Dinpanah-Khoshdargi, E.; Jamshidi, A. 2013. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater*. 9, 7591–7621.
- Wang Y, Liu L, Guo S. 2010. Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro. *Polym Degrad Stab*; 95: 207–13.
- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. 2001. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials*; 22: 1327–33.
- Graeve O. A. Kanakala R, Madadi A, Williams B. C, Glass K. C. 2010. Luminescence variations in hydroxyapatites doped with Eu^{2+} and Eu^{3+} . *Biomaterials*, 31, 4259–4267.
- Liu Y, Wang G, Cai Y, Ji H, Zhou G, Zhao X, Tang R, Zhang M. 2009. In vitro effects of nanophase hydroxyapatite particles on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 15; 90 (4): 1083-91.
- Hu Q, Tan Z, Liu Y, Tao J, Cai Y, Zhan M, Pan H, Xu X, Tang R. 2007. Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Mater Chem.*; 17: 4690.
- Bonewald L. F. 2011. The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*. 26 (2), 229-238. <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>
- Promocell. 2018. Osteoblast Differentiation and Mineralization. Consultado el 22 de noviembre de 2018, de: <https://www.promocell.com/scientific-resources/application-notes/>
- Zavala-Sanchez L, Hirata G, Novitskaya E, Karandikar K, Herrera M and Graeve O. 2015. Distribution of Eu^{2+} and Eu^{3+} Ions in Hydroxyapatite: A Cathodoluminescence and Raman Study. *ACS Biomaterials Science and Engineering* 1 (12), 1306 – 1313

Invitrogen. 2004. Image-iT LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit. Consultado el 22 de noviembre de 2018, de: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp36007.pdf>

Wallin, Richard F. 1998. A Practical Guide to ISO 10993-4: Hemocompatibility. Consultado el 22 de noviembre de 2018, de: https://www.namsa.com/wp-content/uploads/2015/10/A-Practical-Guide-to-ISO-10993-4_-Hemocompatibility.pdf

Satyavrata Samavedi, Abby R. Whittington, Aaron S. Goldstein. 2013. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomaterialia* 9 (9), 8037-8045.

Berube P, Yang Y, Carnes DL, Stover RE, Boland EJ, Ong JL. 2005. The effect of sputtered calcium phosphate coatings of different crystallinity on osteoblast differentiation. *J Periodontol*; 76: 1697–709.

John A, Varma H. K, Kumari T. V. 2003. Surface reactivity of calcium phosphate based ceramics in a cell culture system. *J Biomater Appl*; 18: 63–78.

Atashi F. Modarressi A, Pepper M. S. 2015. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem cell and development*, 24 (10), 1150-1163. doi: 10.1089/scd.2014.0484

Arakaki N, Yamashita A, Niimi S, Yamazaki T. 2013. Involvement of reactive oxygen species in osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells accompanied by mitochondrial morphological dynamics. *Biomedical Research*, 34 (3), 161 – 166.

Mandal C, Ganapathy S, Gorin Y, Mahadev K, Block K, Abboud H, Harris S, Ghosh-Choudhury G y Ghosh-Choudhury N. 2011. Reactive oxygen species derived from Nox mediate BMP2 gene transcription and osteoblast differentiation. *Biochem J* 433, 393-402.

Zhao X, Ng S, Heng BC, Guo J, Ma L, Tan TT, Ng KW, Loo SC. 2013. Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent. *Arch Toxicol.*; 87 (6): 1037-52.

Remya N. S, Syama S, Gayathri V, Varma H. K, Mohanan P. V. 2014. An in vitro study on the interaction of hydroxyapatite nanoparticles and bone marrow mesenchymal stem cells for assessing the toxicological behaviour. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1;117:389-97.

Jung G. Y, Park Y. J, Han J. S. 2010. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. *J Mater Sci Mater Med*;21:1649–54.

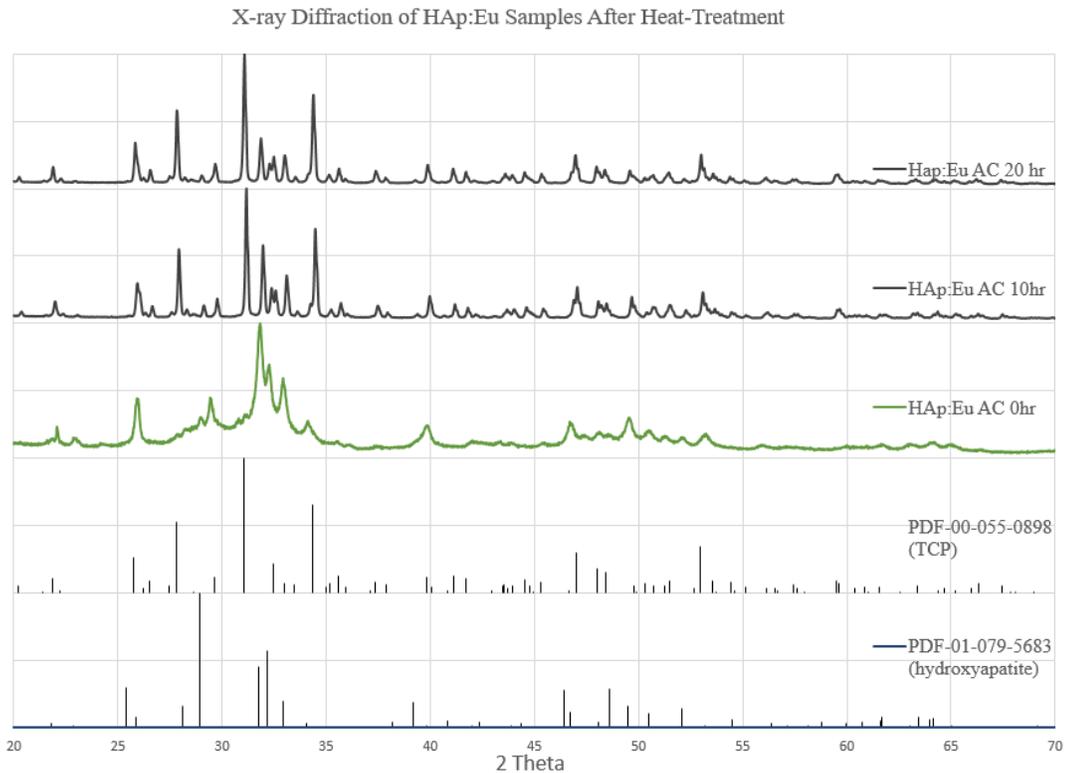
Beck G. R, Zerler B, Moran E. 2000. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*;97:8352–7.

Dourmashkin, R. R. and W. F. Rosse. 1966. Morphologic changes in the membranes of red blood cells undergoing hemolysis. *Am. J. Med.* 41 (5): 699–710.

ANEXOS

Anexo 1. Difracción de rayos-X y porcentaje de TCP.

A continuación, se muestra la comparación de un patrón de rayos-X de las nanopartículas de HA dopadas con europio después de ser tratadas térmicamente y sin tratamiento térmico contra los picos característicos de la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico. Estos datos fueron obtenidos por el M.C. Fabián Martínez del Departamento de Ingeniería Mecánica y Aeroespacial de la Universidad de California, San Diego, U.S.A.



Se puede observar la aparición de picos característicos de la fase TCP en las nanopartículas después de ser tratadas térmicamente.

De manera adicional se calculó el porcentaje de TCP presente en el material:

EuHA	HA			TCP		
	0	10	20	0	10	20
Muestra1	89.26%	72.58%	65.42%	10.74%	27.42%	34.58%
Muestra2	85.66%	65.68%	69.69%	14.34%	34.32%	30.31%
Muestra3	87.78%	61.26%	62.86%	12.22%	38.74%	37.14%
Porcentaje	87.57%	66.51%	65.99%	12.43%	33.49%	34.01%

Se puede observar un aumento en el porcentaje de TCP presente después del tratamiento térmico.