



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO
DE MAGNESIO EN CÉLULAS DE HUESO.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

KENIA SARAI MIRANDA QUIROGA.

TUTOR: Dra. PATRICIA GONZÁLEZ ALVA.

ASESOR: Dr. ALEJANDRO LUIS VEGA-JIMENEZ.

Vo. Bo
[Firma]

[Firma]



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.

Para Matthias

Por recordarme constantemente lo preciosa que es la vida cuando paras un momento y simplemente observas a la naturaleza existir

Agradecimientos.

A mis padres por su apoyo y amor incondicional en cada momento de la vida, por estar conmigo en cada decisión dudosa, no siempre convencidos, pero siempre cuidándome y queriéndome

A mi hermano por formar parte de nuestra aventura de crecer y por ver crecer también a Matt.

A Abril por cada momento, en estos últimos cinco años, en los que nos acompañamos en días buenos, malos y malísimos y porque sin importar como fuese, terminábamos el día felices por tenernos una a la otra.

A Raúl, por el cariño incondicional, por dejar mis pensamientos fluir contigo, por tomar lo mejor de mí y alentarme a intentarlo una vez más.

A mi asesora de tesis, por darme la oportunidad de aprender tanto, por compartir siempre sus conocimientos y tener tanta paciencia conmigo, gracias por renovar en mí el deseo por aprender más allá de lo previamente escrito.

A mi asesor y al laboratorio de bioingeniería de tejidos, por permitirme formar parte de este proyecto e impactar tanto mi vida académica.

El presente proyecto fue financiado por el programa UNAM-DGAPA-PAPIIT-IA105020

Índice

1. Introducción	7
2. Contenido	9
2.1.1 Nanomateriales y nanopartículas	9
2.1.1.1 Definición y generalidades	9
2.1.1.2 Usos en el área médico-odontológica	11
2.1.2 Óxido de Magnesio.....	16
2.1.2.1 Características generales del óxido de magnesio.....	19
2.1.2.1 Toxicidad del óxido de magnesio.....	19
2.1.3 Nanopartículas de óxido de magnesio	20
2.1.3.1 Método mecanoquímico.....	21
2.1.3.2 Caracterización	23
3. Planteamiento del problema	25
4. Justificación	27
5. Hipótesis	28
6. Objetivos	28
7. Metodología	29
8. Resultados	34
9. Discusión	36
10. Conclusiones	39
11. Referencias Bibliográficas.....	40
Anexo.....	43

Tabla 1. Nanopartículas en medicina y odontología y sus aplicaciones	12
Tabla 2. Porcentaje de proliferación celular	34
Figura 1. La estructura de las nanopartículas determina su aplicación, así como su ruta de entrada a la célula. Fuente: Directa. ©Kenia Miranda Quiroga	10
Figura 2, Representación gráfica de los métodos de síntesis para la producción de nanopartículas. Fuente: Directa. ©Kenia Sarai Miranda Quiroga	21
Figura 3. Proceso de síntesis mecanoquímica. Fuente: Directa. ©Kenia Sarai Miranda Quiroga	22
Figura 4. Representación gráfica de la técnica de difracción por rayor X. Fuente: modificado de DOI:10.1030/s41563-018-01163.	25
Figura 5. Comparación de difractogramas	30
Figura 6. . Ensayo de la resazurina.	32
Figura 7. Representación gráfica del número relativo de células presentes en el grupo control y los diferentes grupos experimentales.	35
Figura 8. Microfotografías de los hFOB 1.19 a las 24 h de cultivo con MgO NPs.	36

1. Introducción

Las nanopartículas existen en el planeta generados por procesos naturales e industriales y poseen características físicas y químicas distintas a los mismos materiales en escalas no nanométricas que mediante la nanotecnología son aprovechadas en diversos campos incluyendo la medicina y odontología, lo cual se traduce en nuevas metodologías y tratamientos con resultados más predecibles, controlados y guiados.

El presente trabajo tiene como objetivo revisar conceptos generales acerca de las nanopartículas, su aplicación en medicina y odontología, así como las propiedades y características del Magnesio y el Óxido de Magnesio (MgO) en escalas nanométricas y no nanométricas. A continuación, se utilizó el método de mecano-síntesis para obtener nanopartículas de MgO (MgO-NPs). Finalmente, las NPs-MgO se colocaron en un medio de cultivo y se probaron en una línea celular de osteoblastos humanos (hFOB 1.19), y a partir de ello se evaluó su efecto *in vitro* en dichas células.

Recientemente, los nanomateriales se emplean cada vez más en aplicaciones biológicas y médicas. Por lo anterior es de suma importancia que, antes de pasar a los ensayos clínicos, se pruebe la citotoxicidad de estos materiales en células normales.

El presente estudio explora la interacción de las MgO-NPs producidas con mecano-síntesis en células osteoblásticas humanas por medio de la medición de la proliferación celular, los resultados se discuten en el contexto de las posibles aplicaciones.

Para su realización se realizó una revisión de la literatura, y se diseñó un estudio *in vitro*.

La siguiente parte del presente trabajo discute conceptos generales en el área de materiales nanoestructurados.

EL estudio *in vitro* se realizó en una línea celular de hueso, en condiciones estándares de cultivo, a las que se les agrego diferentes concentraciones de MgO-NPs (5, 20, 50 y 10 μ g/mL). Posteriormente, se midió la viabilidad por medio del ensayo de Alamar-Blue a 24 y 48 h.

La evaluación *in vitro* de los efectos de las MgO-NPs sugiere que estas no son favorables para la aplicación directa en células de hueso, sin embargo, dadas las limitantes del estudio, es preciso realizar evaluaciones a mayor tiempo, y con modificaciones del medio de cultivo celular para determinar los mecanismos de toxicidad de las NPs-MgO que se elaboraron para este estudio.

Diversos estudios han revelado que las MgO NPs inducen citotoxicidad en diversas células humanas, principalmente de cáncer, mientras que los efectos en células de sangre periférica son menores. Lo anterior se ha asociado con la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) causada por las MgO-NPs, que en consecuencia incrementan la apoptosis. Pese a lo anterior, los efectos de las MgO-NPs en células de hueso no ha sido estudiada a profundidad. Por lo que el presente trabajo representa un avance en el área de investigación relacionada con metabolismo óseo.

Los efectos relacionados con la apoptosis mediada por las MgO-NPs a través de la producción de especies reactivas de oxígenos indica su potencial para poder dirigir su aplicación a tejidos diferentes al hueso. Además, sus características bacteriostáticas y bactericidas podrían probarse en materiales inertes con el fin de aprovechar dichas características en el área de odontología.

2. Contenido

2.1.1 Nanomateriales y nanopartículas

Las NPs y sus aplicaciones en la medicina han recibido amplio interés por el potencial que tienen en aplicaciones como la vacunación, las terapias antineoplásicas, el diagnóstico y la mejora en materiales implantados en el cuerpo humano. ⁽¹⁾

Para lo anterior, los científicos buscan fabricar NPs con características únicas, estructuras con área miniaturizada, y por supuesto, que puedan proporcionar una eficacia superior en los sistemas nanométricos. En este sentido, es crítico el entendimiento de las interacciones de las NPs a nivel celular. Por ejemplo, las NPs pueden mediar la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) en las células de cáncer y activar las vías de señalización apoptótica, necrótica, o autofágica.

Además, el área de accesibilidad de las NPs permite que estas interactúen rápidamente con las células y los organelos de estas. Lo anterior ha provocado que gran parte de la investigación con NPs este enfocada al desarrollo de drogas oncológicas. Pero las aplicaciones con NPs cada día se extienden a un mayor número de áreas en medicina y odontología.

Consecuentemente, las pruebas in vivo y los estudios in vitro se realizan para entender el destino de las NPS en los sistemas biológicos.

2.1.1.1 Definición y generalidades

Las nanopartículas poseen dimensiones entre 1 y 100 nanómetros y son consideradas una transición entre un átomo y una molécula. Poseen características físicas y químicas distintas a los mismos materiales en escalas no nanométricas, entre ellas un valor exponencial entre el número de átomos superficiales y el tamaño de la partícula así como propiedades eléctricas,

mecánicas, magnéticas, ópticas y químicas ajustables que pueden ser modificadas cambiando el tamaño o forma de la partícula sin necesidad de cambiar la composición del material, lo que resulta en un rendimiento mejorado de los nanomateriales en comparación a los mismos en escalas macrométricas.⁽¹⁾

Las nanopartículas existen en el planeta generadas por procesos naturales e industriales; como son los métodos de síntesis física, química o mecánica. Existen diversas clasificaciones de las nanopartículas dependiendo de su origen, por su tamaño, por su forma, composición entre otras.

Con base a su origen se clasifican en orgánicas (con base de carbono), e inorgánicas (poliméricas) ⁽¹⁾

La figura 1 muestra una representación gráfica de la clasificación de las nanopartículas con base en su origen.

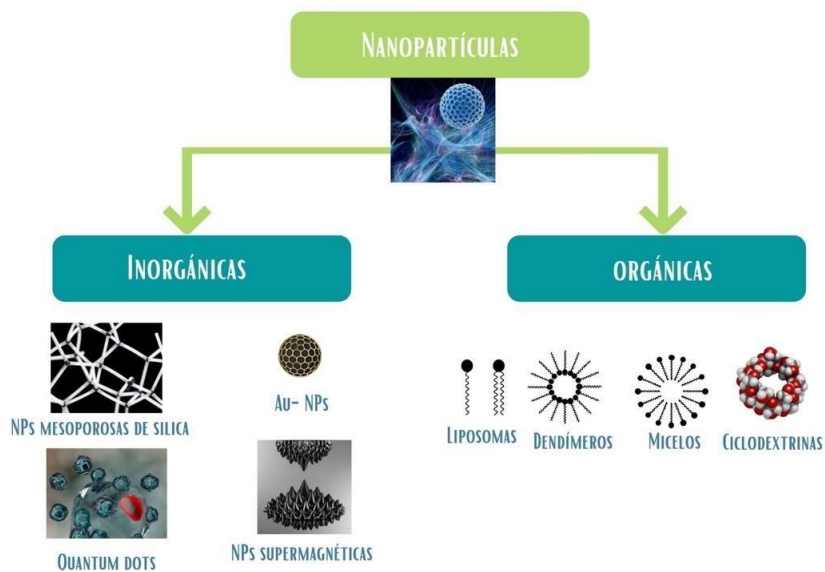


Figura 1. La estructura de las nanopartículas determina su aplicación, así como su ruta de entrada a la célula. Fuente: Directa. ©Kenia Miranda Quiroga

2.1.1.2 Usos en el área médico-odontológica

Los avances en la nanotecnología permiten la aplicación de las nanopartículas en diversos campos tales como, la obtención de energía, la industria textil y electrónica, y la biomedicina entre otros.

Los grandes avances en la biomedicina se han traducido en desarrollos tecnológicos, actualmente empleados para una diversa y amplia gama de aplicaciones, particularmente las nanopartículas, cuyos usos incluyen la quimioterapia, diagnóstico, liberación controlada de fármacos, detección de biomarcadores, entre otros. ⁽²⁾

Es así como la nanotecnología se encuentra influenciado la ciencia y la tecnología. Además, los expertos señalan que la nanotecnología tiene influencia en la economía de los países.

En las últimas décadas la producción de NPs también ha creado la posibilidad de resolver diferentes problemas de la vida diaria, por lo que su uso se ha expandido, y nuevos productos son introducidos cada año.

Por ejemplo, el uso de NPs incrementa el radio área de superficie/volumen, que en consecuencia incrementa la penetración de estas, y su interacción con células y tejidos.

Algunas de las aplicaciones de las nanopartículas en medicina se enlistan en la **Tabla 1**

Tabla 1. Nanopartículas en medicina y odontología y sus aplicaciones ^(2,3,4)

Aplicación	Tipo de desarrollo	Ejemplo
Biodetección y monitoreo en enfermedades crónico-degenerativas	Avances en el campo de biosensores con componentes a nanoescala que aumentan la sensibilidad, la respuesta temporal y permiten monitorear continuamente.	Actualmente se utilizan la glucosa oxidasa, proteínas de unión a la glucosa y moléculas de unión a la glucosa para diseñar sensores de glucosa conjugados con nanopartículas, que funcionan como transductores, lo que permite sensores más amigables para el organismo y proporcionan mediciones más rápidas y precisas.
Estudios de imagen	Nanopartículas en conjugación con biomoléculas que contribuyen al diagnóstico precoz de patologías como diabetes, Alzheimer, cáncer etc. Como agentes de contraste que permiten mejores capacidades de reconocimiento e internalización celular.	La tomografía por emisión de positrones (PET) es un método de diagnóstico que permite observar en imágenes moleculares mediante radiofármacos que funcionan como trazadores radiactivos emisores de positrones representan procesos bioquímicos que ocurren in vivo y permiten detectar precozmente las alteraciones funcionales presentes en ciertas enfermedades. En oncología, se pueden determinar mediante la 2-[18F]fluoro-2-Deoxi-D-glucosa (FDG) procesos fisiológicos característicos de los tumores malignos.
Terapia oncológica	Administración, diseño y mejora de nuevas terapias contra el cáncer. El uso de nanopartículas como fármacos específicos permite mayor concentración de estos en los sitios diana y menor toxicidad para las células sanas, dado que las células cancerosas muestran mayor afinidad hacia las nanopartículas debido al Efecto de mayor Permeabilidad y Retención (EPR). Este efecto se debe a que la vasculatura dentro de una zona tumoral tiene un sistema linfático disfuncional, mientras las células sanas del tejido no canceroso poseen uniones estrechas de las células endoteliales lo que impide el transporte de las nanopartículas administradas a través de ellas.	Se ha investigado la administración simultánea de ADN y fármacos a través de liposomas utilizando nanopartículas de núcleo- capa catiónica que han mostrado mayor eficacia en la supresión del crecimiento del cáncer.

Terapia inmunológica	<p>Desarrollo de coadyuvantes que permitan activar de forma selectiva la inmunidad durante la vacunación</p> <p>Desarrollo de herramientas que permita mejorar la actual comprensión de la regulación inmune.</p>	<p>Dada la actual pandemia por SARS-CoV-2 se han desarrollado vacunas con diferentes enfoques, entre ellos encontramos el desarrollo de vacunas conjugadas con nanopartículas, en búsqueda de ventajas tales como un transporte más eficaz de los antígenos y altos niveles de activación de los centros germinales. La ferritina es una nanopartícula con estabilidad química y térmica que permite proporcionar inmunidad protectora a dosis más bajas y protocolos de distribución a la población más simplificada en áreas donde existan suministros limitados para mantener la cadena de frío que requieren otras vacunas.</p>
Ingeniería de tejidos	<p>Los componentes fundamentales de la ingeniería de tejidos incluyen biomateriales tales como andamios, células y biomoléculas de señalización tales como factores de crecimiento (FG) y factores de diferenciación (FD) que en conjunto permite el éxito de esta.</p>	<p>Diversos nanomateriales han sido estudiados, tales como: nanopartículas, nanotubos, nanofibras y nanodispositivos fabricados con dimensiones menores a 100 nm, con el fin de favorecer el crecimiento celular y la regeneración de tejidos y generar interacciones específicas de célula a célula tales como apego, adhesión, multiplicación y diferenciación.</p>
Administración de fármacos	<p>Las nanopartículas tienen la capacidad de administrar fármacos y bioactivos agentes de forma controlada y sostenida., lo cual proporciona varias ventajas que incluyen la protección de la molécula terapéutica contra la degradación, mantiene la concentración deseada del agente bioactivo y reduce los efectos secundarios. Por lo tanto, la eficacia terapéutica aumenta con el desarrollo de sistemas de entrega efectivo tales como las nanopartículas. Las nanopartículas se internalizan a través de diferentes mecanismos tales como fagocitosis, endocitosis, pinocitosis dependiendo del tipo de NP y el sistema de conjugado de fármacos. La capacidad de internalización dependerá del tipo celular, de la composición de las nanopartículas, la carga superficial, el tamaño y la concentración de estas nanopartículas de vitamina c.</p>	<p>Nano encapsulación de vitamina C (ácido ascórbico)</p> <p>La aplicación de una cubierta delgada de nanopartículas como agente de recubrimiento sobre pequeñas partículas permite proteger la sustancia, facilitar su almacenamiento y manipulación, y protegerla de reacciones de degradación.</p>

Además, la nanotecnología ha ofrecido estrategias novedosas y nuevas metodologías de tratamientos para enfermedades bucodentales. A continuación, se describen algunas de las aplicaciones más comunes en odontología.

Odontología preventiva: En el campo de la odontología preventiva es posible encontrar productos sintetizados con nanopartículas de carbonato de zinc, nanotubos de carbono y oligómeros de ácido acrílico fluoroalquilado, entre otros; la adición de estas nanopartículas en dentífricos y colutorios permiten modular la bioadhesión de películas bacterianas patógenas, y bloquear los túbulos dentinarios para reducir la sensibilidad.

Periodontología: Las nanopartículas de ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico glicólico (PLGA) y vidrios bioactivos, HA nanocristalino, biomembranas (como PLGA, a base de quitina, colágeno modificado, etc.), se han propuesto como medio de entrega selectiva de fármacos a células diana, un ejemplo de ellos es la entrega de factores de crecimiento (GF) como tratamiento terapéutico y versátil con potencial de regeneración óseo y de tejidos blandos, mediante estos se busca corregir defectos óseos y mejorar la osteoconducción y osteoinducción.

Odontología restauradora: La principal aplicación de nanopartículas en esta área se relaciona con aprovechar la gran superficie disponible en las mismas para mejorar los materiales en sus características de resistencia, manejo, propiedades ópticas y estéticas.

Prótesis bucal (prostodoncia): Las nanopartículas poseen propiedades antimicrobianas efectivas, de amplio espectro y de liberación sostenida, es por ello por lo que al ser incorporadas en materiales tales como acondicionadores de tejidos y acrílicos para prótesis removibles pueden reducir la carga microbiana de la cavidad bucal y por lo tanto mejorar la salud de los tejidos periodontales. Asimismo, las nanopartículas han sido utilizadas

para mejorar la resistencia a la abrasión, mejorar la dureza de la superficie y la tenacidad a la fractura.

Las NPs de sílice han demostrado un efecto promotor sobre los osteoblastos, aumento de la mineralización y de los genes de expresión asociados con la diferenciación de osteoblastos, lo cual sugiere que pueden alterar el comportamiento celular y de la matriz extracelular, es por ello que el recubrimiento de implantes con nanopartículas de sílice o vidrios bioactivos permite obtener buenas propiedades mecánicas y bioactividad, mayor tasa de integración y fijación ósea, mayor biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedades antibacterianas; todas estas características convierten a los nanomateriales en materiales adecuados para diseñar andamios para regeneración de hueso alveolar, y obtener así cicatrización predecible, controlada y guiada.

Endodontología: Investigaciones recientes han informado el uso de nanopartículas para mejorar las propiedades de desinfección de los conductos radiculares y las reacciones de los tejidos a los mismos, así como la incorporación de nanopartículas en materiales de obturación para obtener un mejor sellado, entre ellos nanomateriales de carbono añadidos a endopostes de fibra de vidrio que prometen módulos elásticos más cercanos a la dentina, menor erosión y menor costo así como reducción de tiempo de fraguado y aumento de la micro dureza.

Ortodoncia: Existen estudios in vitro en los que se ha probado recubrir alambres de ortodoncia de acero inoxidable con nanopartículas biocompatibles para reducir la fricción, disminuir la deformación elástica, aumentar la resiliencia y disminuir la disipación de energía y desgaste, sin embargo, debe evaluarse la biocompatibilidad en animales, modelos y ensayos en humanos.

También se ha sugerido el uso de nanopartículas en adhesivos y resinas usadas para la cementación de brackets que buscan reducir la posibilidad de formación de caries debajo de los mismos durante el tratamiento; además se ha propuesto el uso de módulos como portadores para entrega de nanopartículas con funciones anti cariogénicas, antiinflamatorias y antibióticas, reduciendo así la asociación de dolor, irritación de mucosas causadas por brackets, los investigadores han trabajado en el desarrollo de brackets con sensores mecánicos tridimensionales que permitan medir fuerzas en tiempo real. ⁽⁵⁾

2.1.2 Óxido de Magnesio

El magnesio es un ion esencial (Mg^{2+}) esencial para la salud, y que juega un rol fisiológico importante en las funciones cerebrales, cardiacas, y en el músculo esquelético. El Mg^{2+} tiene propiedades antiinflamatorias y actúa como un antagonista del calcio; sus dosis recomendadas diarias son 420 mg para hombres y 320 mg para las mujeres de acuerdo con la junta de nutrición y alimentos de estados unidos (instituto de medicina (US) comité científico de evaluación dietaría ⁽⁶⁾

El primer uso del Mg^{2+} en medicina humana se registró en 1697 cuando el Dr. Nehemiah Grew identificó al sulfato de magnesio ($MgSO_4$) como un ingrediente en la sal de Epsom, esta sal se usaba en Inglaterra para tratar dolor abdominal, constipación, calambres musculares, enfermedades de la membrana hialina, y edema cerebral. ⁽⁷⁾

El rol del Mg^{2+} en el cuerpo humano surge después de que este se describió como parte del plasma humano por Willey Glover Denis en 1920; y en 1926 Jehan Leroy demostró que el magnesio era esencial para la vida en ratones.

Desde entonces el magnesio se ha utilizado para tratar una variedad de enfermedades que incluyen las migrañas, enfermedades cardiovasculares, y la diabetes. Pese a la importancia del Mg^{2+} los valores de magnesio en sangre casi nunca se determinan en estudios de laboratorio, por lo anterior es común denominarlo el catión “olvidado” de la salud humana ⁽⁷⁾

Los efectos del magnesio han sido descritos en diferentes aparatos y sistemas del organismo, mismos que se mencionan a continuación.

Sistema neuromuscular: el magnesio tiene efecto sedante sobre el sistema nervioso, su deficiencia puede producir hiper excitabilidad neuromuscular afectando al sistema nervioso central y el periférico. En el músculo deprime la excitabilidad de la fibra estriada y lisa lo cual aumenta el rendimiento muscular participando en el almacenaje y utilización energética, así como en constituir moléculas de actina y su solubilizar la miosina.

Sistema cardiomuscular: el magnesio actúa como un calcio-antagonista por lo que disminuye la conductividad y la irritabilidad, tiene propiedades cardioprotectoras, antihipóxicas y antiisquémicas, en el sistema circulatorio puede proteger las paredes vasculares pues impide los acúmulos de calcio y las alteraciones del tejido conjuntivo. Por esta razón los pacientes con deficiencia de magnesio son más propensos a presentar cardiopatías y problemas vasculares.

Sistema óseo y cartilaginoso: el magnesio es un elemento que favorece el crecimiento y mineralización ósea, así como la formación de colágeno y al inicio de la osificación. La deficiencia de este ion produce una menor receptividad a la vitamina D y a la hormona paratiroidea lo cual puede inducir regeneración ósea deficiente.

Sistema renal: a nivel renal el magnesio es necesario para la conservación del fósforo, potasio y aminoácidos, interviene en la respuesta a

la hormona antidiurética y en la eliminación de ácidos, por lo cual el déficit magnésico puede agravar la calcinosis renal.

Aparato digestivo: el magnesio participa en la síntesis de enzimas y mucinas de los jugos digestivos, en la síntesis de hormonas polipéptideas intestinales y estimula la secreción de jugo pancreático, así como la activación de funciones hepáticas de metabolismo y detoxificación. La deficiencia grave y prolongada de magnesio puede afectar al intestino y en raras ocasiones al páncreas.

Sistema endocrino: el magnesio presenta múltiples interacciones con diferentes hormonas, entre ellas encontramos la síntesis de la insulina, el almacenamiento y liberación de catecolaminas, y la acción agónica sobre los receptores periféricos de las hormonas y antagónica en algunas otras.

Sistema inmune: en el sistema inmune ejerce múltiples funciones, las cuales incluyen, funciones antihipóxicas, antialérgicas, antianafilácticas y antiinflamatorias; estimula la fagocitosis y el sistema del complemento, interviene las reacciones redox y los mecanismos de termorregulación. Su deficiencia reduce las tasas de citocromo P450 e incrementa la citotoxicidad, produce alteraciones en el timo y bazo, acelera la formación de radicales libres y aumenta la sensibilidad a la peroxidasa lo cual en conjunto favorece un proceso de envejecimiento acelerado.

Otros sistemas: el magnesio tiene un papel importante en la transmisión genética en los gametos y activar la movilidad de los espermatozoides, tiene intervención en la síntesis de surfactante es en el pulmón lo cual es fundamental para el proceso respiratorio, es un factor preventivo contra las cataratas, y tiene un papel activo en la fisiología de la vista oído y olfato. ⁽⁸⁾

2.1.2.1 Características generales del óxido de magnesio

El ion magnesio se coordina casi exclusivamente con oxígeno y nitrógeno en sistemas biológicos. Es capaz de unirse electrostáticamente a los grupos cargados negativamente en las membranas, proteínas y ácidos nucleico, además es capaz de influir sobre la unión de otros cationes como el calcio y las poliaminas.

Tiene un efecto protector y estabilizador de la membrana que pueden ser atribuidos a los efectos eléctricos y la inhibición de la fosfolipasa A2.

En muchas reacciones bioquímicas es reemplazado por poliaminas, está implicado en la síntesis de DNA, RNA y proteínas. Es un cofactor en centenares de reacciones enzimáticas y frecuentemente modula el transporte iónico por bombas, transportadores y canales y controla los efectos que de ellos parten. ⁽⁸⁾

2.1.2.1 Toxicidad del óxido de magnesio

Las manifestaciones en intoxicación por Mg en concentraciones séricas mayores a 8 mEq/L provoca depresión del sistema nervioso central y a concentraciones séricas mayores a 20 mEq/L durante la anestesia profunda llevan progresivamente a coma y muerte.

Para el caso de NPs de óxidos metálicos, en general, poseen propiedades electrónicas únicas, debido a sus dimensiones y a una superficie específica, esto las convierte en candidatos ideales para interactuar con las bacterias, es por ello por lo que se han convertido en una alternativa para combatir bacterias resistentes a la acción de antibióticos.

Recientemente, se han estudiado aplicaciones prometedoras, por mencionar algunas: aplicaciones ambientales, el desarrollo de tratamientos oncológicos, y como vectores para la producción de vacunas.

2.1.3 Nanopartículas de óxido de magnesio

Las nanopartículas de óxidos metálicos en general poseen propiedades electrónicas únicas, debido a sus dimensiones y a una superficie específica, son candidatos ideales para interactuar con las bacterias, es por ello por lo que se han convertido en una alternativa para combatir bacterias resistentes a la acción de antibióticos.

Las MgO-NPs, por ejemplo, tienen una alta estabilidad térmica, su síntesis es de bajo costo y tienen un potencial considerable como agentes antibacterianos; así como evaluaciones acerca de la actividad antibacteriana, destacando su actividad contra cepas tales como: *Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, y *Staphylococcus aureus*, en las que se demostró la eficacia antibacteriana de las nanopartículas a través del mecanismo de estrés oxidativo y formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) lo que conduce a la muerte microbiana aguda.^(9, 10)

Sobre la investigación relacionada con la actividad anticancerígena de las NPs, se requieren el desarrollo de experimentos *in vitro*, y modelos de simulación computacional que vayan en concordancia con la aplicación que se le desea dar a las NPs.^(9, 10)

Sobre la investigación relacionada con la actividad anticancerígena de las NPs, se requieren el desarrollo de experimentos *in vitro*, y modelos de simulación computacional que vayan en concordancia con la aplicación que se le desea dar a las NPs. Para el desarrollo de fármacos, por ejemplo, es necesario comprobar la potencia de las NPs y sus efectos secundarios *in vitro*, ya que este tipo de experimentos proporcionan datos sobre los agentes, y que sean relevantes para las condiciones *in vivo*.⁽⁸⁾

2.1.3.1 Método mecanoquímico

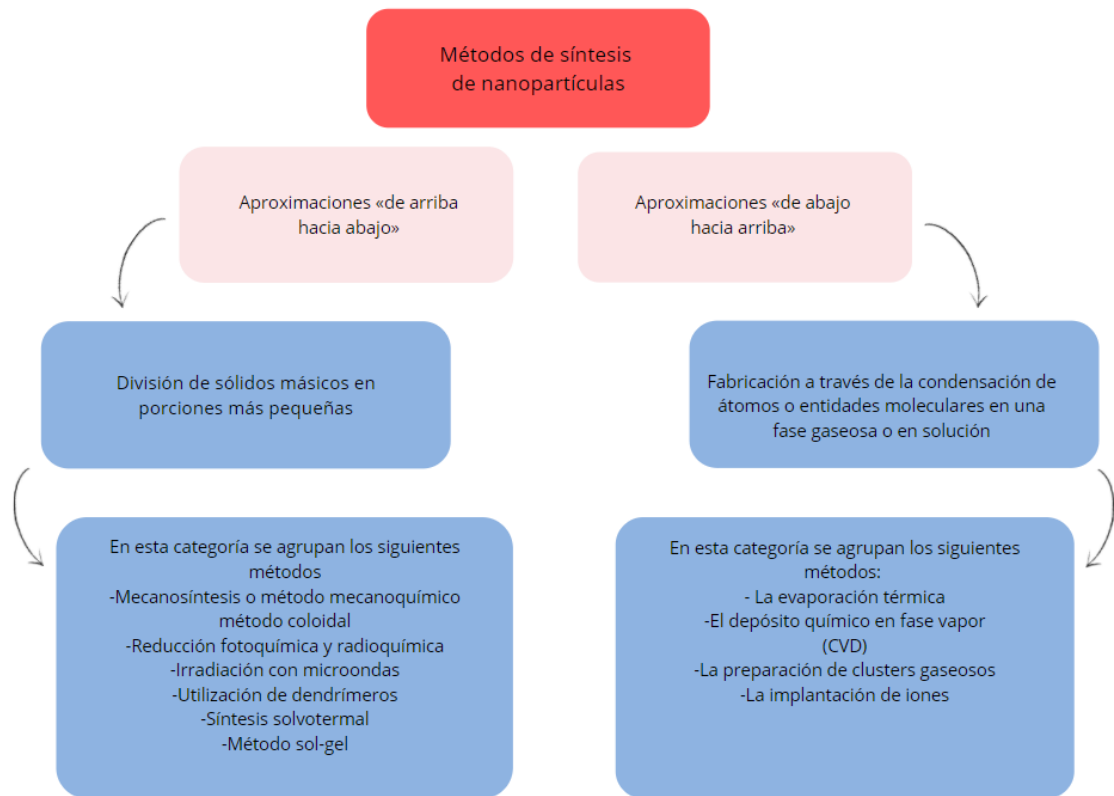


Figura 2, Representación gráfica de los métodos de síntesis para la producción de nanopartículas. Fuente: Directa. ©Kenia Sarai Miranda Quiroga

En la figura 2 se muestra una representación gráfica del método mecanoquímico, el cual permite sintetizar materiales a partir de reactivos en estado sólido. La activación mecanoquímica cambia su reactividad lo cual permite que se lleven a cabo reacciones químicas, que a temperaturas habituales de trabajo no se muestran, así, se pueden obtener nuevos compuestos con dimensiones nanométricas. Este tipo de síntesis es especialmente útil dado la sencillez del método y su bajo impacto ambiental.

(10)

Es así como, mediante la mecano-síntesis es posible obtener nanoestructuras de óxidos metálicos con características nanométricas. La figura 3 ilustra los pasos que sigue el método mecanoquímico.

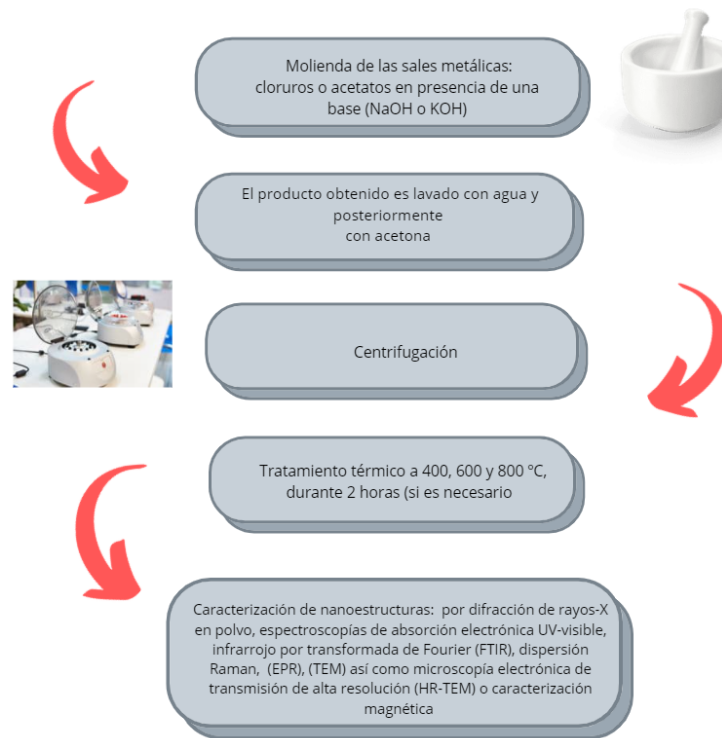


Figura 3. Proceso de síntesis mecanoquímica. Fuente: Directa. ©Kenia Sarai Miranda Quiroga

El primer paso para la síntesis de nanopartículas es balancear la reacción química con los reactivos y sales de partida. Se multiplica el peso molecular del compuesto (hidróxido de magnesio ($Mg(OH)_2$) por la concentración de 1×10^{-3} moles. posteriormente, se coloca en un mortero de ágata y se activa la reacción química por medio de la molienda, con una duración de 10 minutos. Una vez que se obtuvo el producto de la reacción química, el material se introduce en crisoles y se calcina a $800^\circ C$ durante 2 horas. ⁽¹¹⁾

Las nanopartículas se resguardan en frascos de vidrio hasta su posterior uso para caracterización y cultivo celular.

2.1.3.2 Caracterización

El siguiente paso en la producción de NPs se enfoca en la caracterización de estas mediante diversas técnicas, las cuales permiten conocer el tamaño, forma, dispersión y estructura cristalina de las nanopartículas.

El tamaño es una de las propiedades básicas para la caracterización de las nanopartículas, el tamaño y morfología de la partícula se miden comúnmente mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopia electrónica de transmisión (TEM).

A diferencia de los microscopios ópticos que son empleados para observar materiales de tamaño micrométrico, cuya resolución no puede mejorarse por el límite de la longitud de onda de la luz blanca con la que se ilumina el objeto, los microscopios electrónicos permiten observar objetos en escala nanométrica, usando un haz de electrones fuertemente acelerados cuya longitud de onda es menor que la de la luz visible e incluso que el de la luz ultravioleta. ⁽¹²⁾

La microscopia electrónica de transmisión (TEM) es una técnica en la que un haz de electrones se transmite a través de un espécimen ultradelgado, la información que utiliza es la de los electrones transmitidos, la imagen se magnifica y es enfocada por lentes magnéticos para posteriormente formar la imagen en una pantalla fluorescente.

En el TEM la muestra cristalina interactúa con el haz de electrones más por difracción que por absorción, por lo que la intensidad de la difracción dependerá de la orientación de los planos de los átomos en un cristal en

relación con el haz de los electrones, así a ciertos ángulos el haz de electrones es difractado fuertemente desde el eje del haz entrante mientras que en otros ángulos el haz es en gran parte transmitido.

Además de esto, los microscopios electrónicos de transmisión están equipados con porta muestras que permiten inclinar el espécimen en un rango de ángulos para obtener condiciones de difracción específicas mediante esta se pueden formar imágenes de alto contraste, bloqueando los electrones desviados fuera del eje óptico del microscopio y permitir solamente los electrones no dispersados, esto produce variaciones en la intensidad electrónica y revela información sobre la estructura del cristal (campo claro), también es posible producir imágenes de electrones desviados por un plano cristalino particular (campo oscuro).

En el modo de operación de campo claro los objetos de interés contrastan en la escala de grises negros sobre un fondo claro mientras que en el modo de campo oscuro se alinea uno de los haces difractado con el eje óptico del microscopio, filtrando esta información mediante el uso de la apertura objetiva. ⁽¹²⁾

Además de los métodos de caracterización previamente mencionados, existen algunos que permiten medir la carga superficial, el estado de aglomeración, distribución del tamaño, la estructura o cristalización de las nanopartículas (figura 4).

En esta última propiedad se utiliza una técnica llamada difracción de Rayos X (XRD); esta es una técnica analítica primaria, no destructiva, utilizada para identificar las fases de un material cristalino y propiedades estructurales como tamaño de grano, dimensiones de la celda unitaria, distancias interplanares, entre otras. ⁽¹³⁾

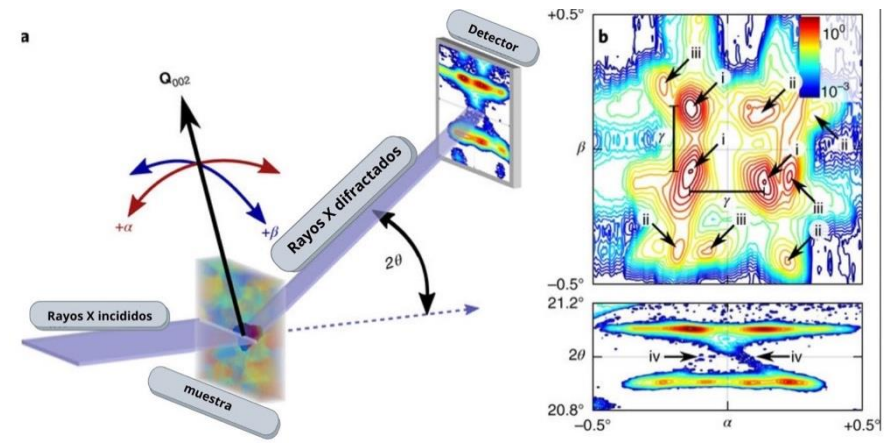


Figura 4. Representación gráfica de la técnica de difracción por rayos X. Fuente: modificado de DOI:10.1030/s41563-018-01163.

3.

Planteamiento del problema

A lo largo de las últimas décadas el magnesio se ha considerado como tratamiento para diversas enfermedades, tales como, la preeclampsia, las embolias, el infarto al miocardio y el asma. Lo anterior ha derivado en el interés de neurólogos, cardiólogos y neumólogos.

Pese a lo anterior los niveles de magnesio no se determinan en los estudios rutinarios de laboratorio sin embargo la deficiencia de magnesio puede causar calambres, arritmias, y por lo tanto se debe considerar su medición cuando el paciente presenta este tipo de síntomas.

Los mecanismos moleculares involucrados en los efectos del magnesio en el cerebro, el corazón, los pulmones y el hueso siguen siendo poco estudiados, y en las últimas décadas la investigación se ha centrado sobre el efecto en intestino y los riñones.

Pero los estudios sobre este elemento en el corazón, cerebro, pulmones y hueso son fundamentales para su adecuada aplicación clínica. ⁽⁸⁾

En el caso de las MgO-NPs, estas han sido ampliamente estudiadas por sus actividades antibacterianas contra patógenos en la comida, y por su efecto antifúngico contra *Candida albicans*. Además, las MgO-NPs se han utilizado por su potencial en la administración de fármacos, imágenes de resonancia magnética, y en sistemas que requieren de hipertermia. En conjunto, la literatura revela que estas poseen excelentes propiedades antimicrobianas que podrían ser utilizadas en seres vivos.

Sin embargo, las MgO-NPs han sido poco estudiadas para aplicaciones como actividades anticancerígenas o de regeneración tisular, principalmente en odontología. Es por ello por lo que el presente trabajo explora la actividad de las MgO-NPs en una línea celular de osteoblastos humanos para su posible aplicación en estrategias de regeneración tisular. Las pruebas de toxicidad *in vitro* aumentan el conocimiento existen sobre las NPs y permite el planteamiento de posibles aplicaciones específicas, que podrían ser aprovechadas en algún campo de la odontología.

4. Justificación

En el área de bioingeniería de tejidos el desarrollo de nanopartículas y materiales nanoestructurados abre la posibilidad de mejorar los procesos de osteointegración durante la colocación de implantes dentales, pues mediante el uso de andamios y recubrimientos es posible lograr una mayor tasa de integración y fijación en comparación con terapias de regeneración ósea convencionales.

Además, y gracias a sus propiedades antibacterianas los recubrimientos a base de nanopartículas reducen la susceptibilidad a la infección, es por ello que actualmente se realizan líneas de investigación dirigidas a desarrollar nanopartículas y nanoestructuras que permitan una regeneración de tejidos más predecible, controlada y guiada.

Las MgO-NPs han demostrado ser una alternativa para combatir bacterias resistentes a la acción de antibióticos, tales como la *Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, y *Staphylococcus aureus*.

Mas aún, las MgO-NPs pueden producirse mediante métodos de mecano-síntesis, este método tiene coste económico y es amigable para el medio ambiente, dado que no requiere de equipo especializado y durante el mismo no se produce un alto impacto ambiental constituye una opción viable para el desarrollo y estudio de materiales nanoestructurados.

Sin embargo, estudios que sobre los efectos y la interacción de las MgO NPs en el contexto del metabolismo óseo siguen siendo escasos, es por ello por lo que medir el efecto in vitro de las MgO-NPs profundiza el conocimiento existente, y permite reconocer posibles aplicaciones de estas NPs en el contexto de la regeneración tisular.

5. Hipótesis

La adición de en el medio de cultivo de las células osteoblásticas humanas hFOB 1.19 tendrán efectos sobre la viabilidad y morfología de dichas células a 24 y 48 h, y es efecto dependerá de la concentración de las NPs en el medio.

Hipótesis nula: La adición de MgO NPs en el medio de cultivo de las células osteoblásticas humanas hFOB 1.19 no tendrán efectos sobre la viabilidad y morfología de dichas células a 24 y 48 h, independiente de la concentración.

6. Objetivos

- Revisar conceptos generales acerca de la aplicación de MgO-NPs en medicina y odontología.
- Producir MgO NPs a través de un método de mecosíntesis.
- Evaluar la toxicidad in vitro de las MgO NPs en células hFOB 1.19 mediante el ensayo de resazurina.
- Realizar análisis estadístico de los resultados experimentales mediante las pruebas de ANOVA y Tukey post hoc ($p \leq 0.05$).
- Analizar el efecto de las nanopartículas de MgO sobre la morfología celular mediante microscopia óptica.

7. Metodología

7.1 Producción de las nanopartículas

El primer paso para la síntesis de nanopartículas es balancear la reacción química con los reactivos y sales de partida. Se multiplica el peso molecular del compuesto (hidróxido de magnesio ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) por la concentración de 1×10^{-3} moles; posteriormente, se coloca en un mortero de ágata y se activa la reacción química por medio de la molienda, con una duración de 10 minutos.

Una vez que se obtuvo el producto de la reacción química, el material se introduce en crisoles y se calcina a 800°C durante 2 horas. Las nanopartículas se resguardan en frascos de vidrio hasta su posterior uso para caracterización y cultivo celular. Después, mediante la técnica de caracterización de TEM, se corroboró mediante un análisis con diversas mediciones y micrografías, el tamaño promedio de las MgO-NPs.

La caracterización por XRD y TEM revela que las MgO-NPs producidas tenían aproximadamente 21.25 ± 2.5 de diámetro promedio.

La figura 5 muestran que las MgO-NPs producidas con la técnica de mecano-síntesis tienen diversas formas, entre las cuales destaca la morfología poliédrica, igualmente se puede ver que las NPs producidas tienen formas alargadas, y se confirmó que estas tienen tamaños menores a 100 nm.

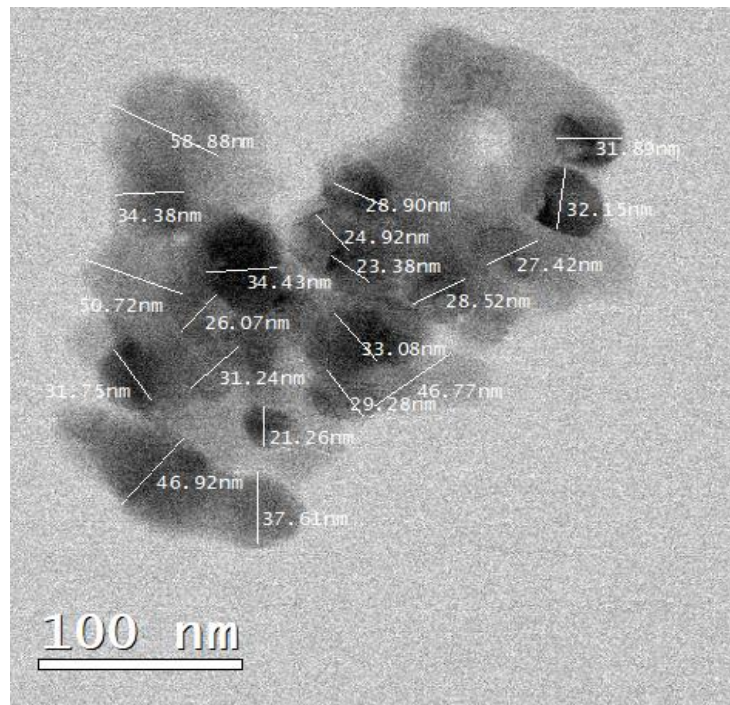
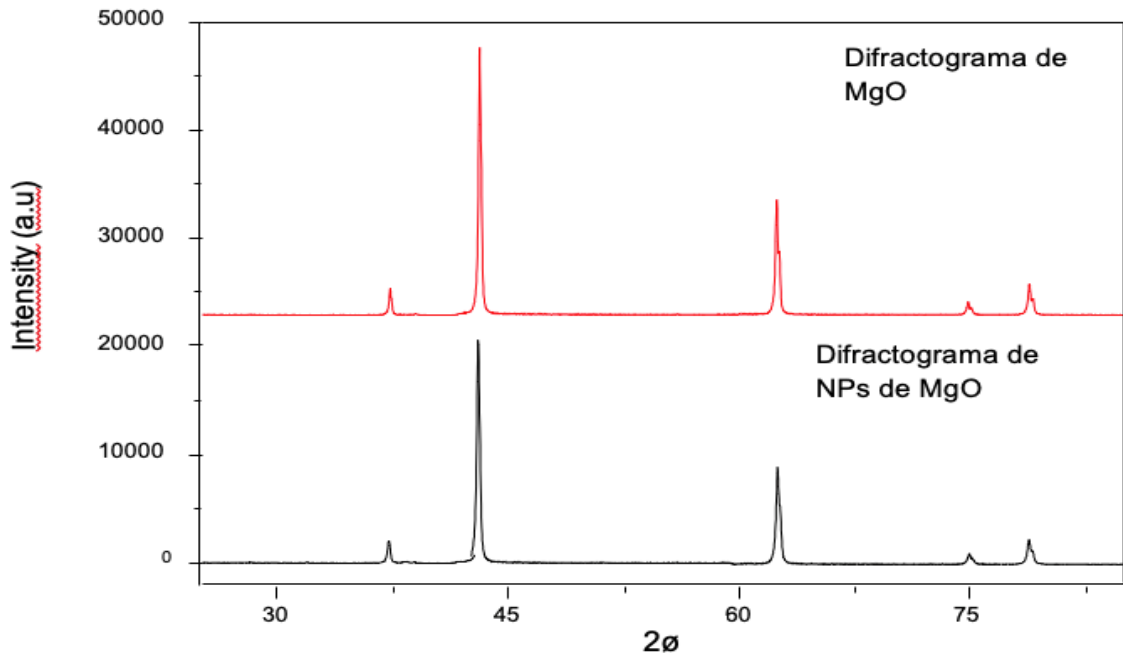


Figura 5. Comparación de difractogramas

de a) MgO y b) MgO-NPs: a base de $Mg(OH)_2$. Los resultados de las nanopartículas utilizadas en este estudio (a: en base de $Mg(OH)_2$), los difractogramas muestran picos de fuerte intensidad en (111), (200), (220), (311) y (222) que se atribuyen a la fase de MgO cúbico. Los picos de difracción son muy agudos, lo que indica que la fase de las NPs-MgO está bien cristalizada, sin registrarse otros picos que indicaban la presencia de otros elementos que no pertenecen a la estructura cristalina del MgO. Se muestra la micrografía por TEM donde se muestran las MgO-NPs con un tamaño menos de 100 nm Fuente: Directa

7.2 Cultivo celular y condiciones de exposición

La línea celular de osteoblastos humanos (hFOB 1.19) del proveedor ATCC (American Type Cell Culture Collection, CRL-11372) fue cultivada con Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Corning Mediatech Inc. VA, USA) de alta glucosa (4.5 g/l), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, solución anti-anti (Gibco Life Technology Corporation, NY, USA) al 1% en una incubadora con 5% de CO₂, 100% de humedad y a 37 grados centígrados.

El medio de cultivo se cambió cada dos días, las células se utilizaron entre el segundo y el tercer pase, y cuando estaban a 80% de confluencia. Las células se utilizaron a una densidad de 1×10^4 células por mililitro.

Para los experimentos de exposición las nanopartículas de MgO se prepararon al momento que se iniciaban los experimentos a una concentración de 1mg/ml en medio de cultivo completo y se sonicaron a temperatura ambiente durante 15 minutos para evitar su agregación/aglomeración.

Posteriormente las células se expusieron a las concentraciones finales de 5, 20, 50 y 100 µg/ml. El tiempo de exposición fue de 24 y 48 h; todos los experimentos se realizaron por triplicado con tres repeticiones en cada ocasión.

7.3 Ensayo de citotoxicidad

Los efectos sobre la viabilidad de MgO-NPs en células osteoblásticas se determinaron mediante el ensayo de resazurina. Las células no expuestas a las nanopartículas se consideraron como el control negativo.

La resazurina es un indicador celular permeable para reacciones de oxido- reducción (redox), que se utiliza para monitorizar el número de células viables en cultivo. La resazurina se disuelve en soluciones tamponadas

fisiológicas (PBS) resultando en una solución de color azul profundo, y al añadirse directamente a las células de manera homogénea se oxida en una solución de color rosa brillante.

Las células metabólicamente activas pueden reducir la resazurina (Azul) en un producto de resofurina (rosa) el cual es fluorescente (figura 6). Este cambio de color emite fluorescencia, y puede ser leído con un espectrofotómetro.

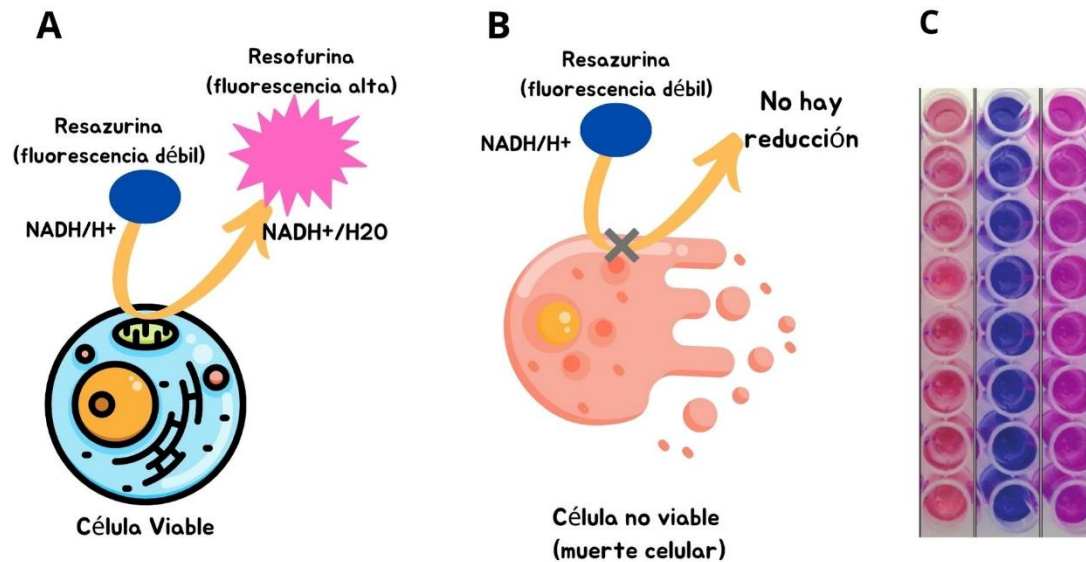


Figura 6. . Ensayo de la resazurina.

Fuente: Directa. (A) La sal de resazurina carece de fluorescencia y tiene un color azul, al introducirse a una célula viable se reduce en la mitocondria, y su metabolismo; (B) en las células muertas o no viables no existe metabolismo y la sal no se metaboliza; (C) en la columna de la derecha se observa el cultivo sin sal, en la columna de en medio se ha añadido la sal, la cual es metabolizada en la mitocondria y se vuelve fluorescente (columna de la izquierda).

La cantidad de resofurina producida es proporcional al número de células viables, misma que se puede cuantificar usando un espectrofotómetro.

Para la evaluación del ensayo se midieron las densidades ópticas (ODs) mediante un espectrofotómetro para placas de ELISA (CHROMATE, Awareness Technology Inc.), y utilizando los filtros de emisión a 590 nm y de excitación a 600 nm.

La viabilidad se calculó dividiendo la OD media de las células tratadas entre la OD media del control x 100.

8. Resultados

Los efectos de las MgO-NPs se determinaron mediante el ensayo de resazurina; después de 3 horas de incubación a 37 grados centígrados se cuantifico la proliferación celular basada en la OD. Las células no expuestas a las MgO-NPs se consideraron como control, y los resultados se expresan en porcentaje (%) comparado con el control. A partir de la OD se calculó la cantidad relativa de células.

Todos los tratamientos (5, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) después de 24 horas tuvieron efecto sobre la proliferación de los osteoblastos hFOB 1.19, con un aumento 43.9%, 35.7%, 34.9% y 36% sobre el control (tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de proliferación celular

Concentración de NPs	Horas en cultivo		
	0 h	24 h	48 h
100 mg/ml micro	100	136	57.46
50	100	134.9	64.09
20	100	135.7	77.33
5	100	143.9	65.56
Control	100	110.0	120

NPs, nanopartículas; h, horas. Los resultados están expresados en porcentaje que se calculó con la fórmula % de proliferación igual a densidad óptica experimental / densidad óptica del plato control x 100

Una reducción de la viabilidad celular importante se observó a las 48 h siendo la concentración más citotóxica la de 100 $\mu\text{g/ml}$ y la menos tóxica la de 20 $\mu\text{g/ml}$ seguida de la de 5 $\mu\text{g/ml}$ (figura 7).

Las siguientes gráficas presentan los resultados de la densidad óptica de los diferentes experimentos realizados.

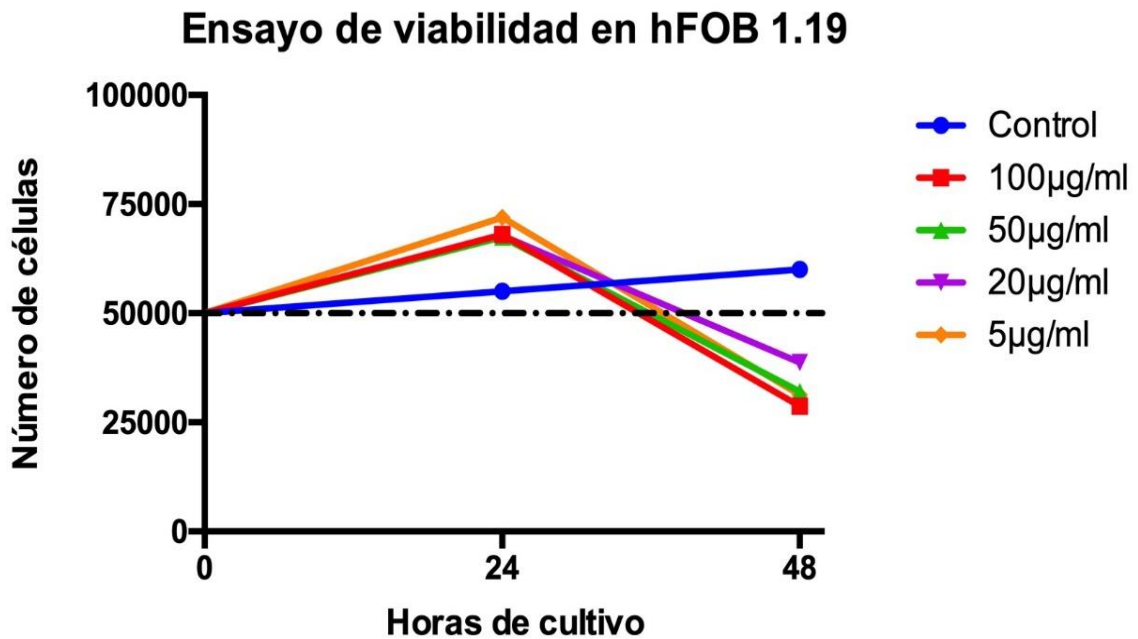


Figura 7. Representación gráfica del número relativo de células presentes en el grupo control y los diferentes grupos experimentales.

La concentración de células aumenta las 24 h en todos los grupos estudiados, y sigue aumentando en el grupo control. Todas las concentraciones provocaron una disminución en la viabilidad celular de los grupos experimentales. Los resultados muestran la media de tres diferentes experimentos con 3 repeticiones cada vez y la desviación estándar. Fuente directa.

Las células mostraron internalización de las MgO NPs, junto con formación de cuerpos apoptóticos, sin evidencia de otras alteraciones (Figura 8)

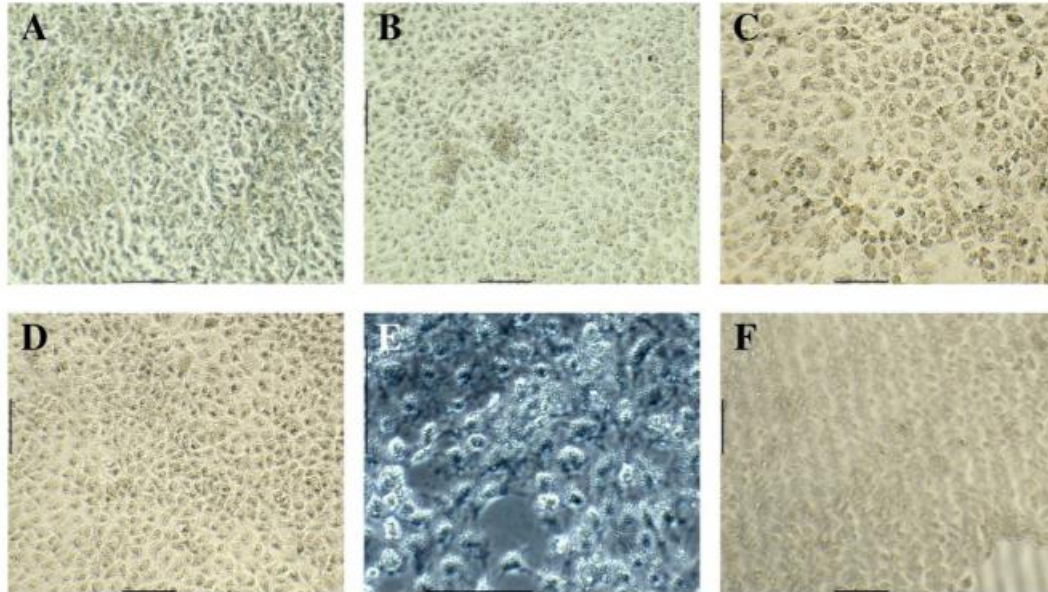


Figura 8. Microfotografías de los hFOB 1.19 a las 24 h de cultivo con MgO NPs.

A, concentración de 100µg/ml; B, concentración de 50µg/ml; C, concentración de 20µg/ml; D, concentración de 5µg/ml; E, magnificación de las células hFOB 1.19 incubadas con 500µg/ml. F, control. A, B, C, D, F magnificación de 20X. E, magnificación de 40X. A, B, C, D, presentan una morfología similar a la del control (F), pequeñas, ahusadas, con prolongaciones citoplasmáticas alargadas, manteniendo su adhesión. La magnificación (E) de la concentración de 500µg/ml revela que las células a las 48 h de cultivo muestran cuerpos apoptóticos en su citoplasma, caracterizados por la formación de vesículas pequeñas, pero mantienen la adhesión al plato de cultivo. Fuente directa.

9. Discusión

Las MgO NPs utilizadas en el presente trabajo fueron caracterizadas por las técnicas de XRD y TEM; mediante estas técnicas se observó que el tamaño de las partículas en estado seco era de 21.25 ± 2.5 nm. Otros estudios similares reportan tamaños promedios de aproximadamente de 52.79 nm. (10,12)

La diferencia entre los resultados existentes y los presentados en el presente trabajo puede estar relacionada con la cantidad de las sales de partida que se establecieron en la metodología. Dependiendo del tipo de

síntesis utilizada las NPs pueden presentar diferentes tamaños de las partículas. ^(14,15)

El presente trabajo evaluó los efectos de las MgO-NPs en una línea de osteoblastos humanos a las 24 y 48 horas. Los ensayos revelaron que a las 24 horas de cultivo las MgO-NPs favorecen la proliferación celular hasta en un 43.9%; sin embargo, después de 48 horas la viabilidad disminuye hasta el 77.3 % con la concentración de 20 μ /ml.

Es así como, los datos muestran que las MgO-NPs reducen dramáticamente la viabilidad de los osteoblastos después de 48 h. Similares resultados se han visto en la línea celular K562, una línea celular de origen mesenquimal, similar a la línea hFOB 1.19. Por el contrario, se ha visto que, en células sanguíneas, la viabilidad no disminuye con las MgO-NPs en dosis menores a 30 μ g/ml. ⁽¹⁴⁾

Lo anterior podría significar que las MgO NPs tienen una actividad diferente dependiendo del tipo de célula en la que se estén introduciendo.

En el presente trabajo, todas las concentraciones utilizadas resultaron en una disminución mayor al 85% de la viabilidad celular lo cual se considera toxico para las células, y la disminución correlaciono con la concentración de las MgO NPs. Es decir, a mayor concentración, mayor disminución en la viabilidad.

Los resultados sugieren que las MgO-NPs no son favorables para su aplicación directa en células osteoblásticas, pero podrían servir para aplicaciones diferentes a las relacionadas con implantología, tales como su uso antimicrobiano.

Por ejemplo, estas se podrían utilizar en dentífricos y colutorios, para evitar la formación de películas bacterianas patógenas, así como la carga bacteriana de las mismas o bien como modificaciones a materiales

restauradores existentes para mejorar la capacidad antimicrobiana de los mismos (Anexo I).

Además, las NPs de óxidos metálicos son relativamente nuevas en el mundo nano, por lo que se ha intentado probarlas en muchas áreas. En el área clínica, se busca su utilización debido a que los métodos actuales para producir NPs útiles en este campo generalmente son dañinos con el ambiente, además de ser muy caros

Una de las limitantes del estudio fue su corta duración por lo que se sugieren más lecturas a mayor tiempo, modificar el medio, y estudiar la posibilidad de que el cambio en el pH del medio de cultivo, provocado por las MgO NPs sea la causa de la toxicidad para las células empleadas.

También, es necesario realizar ensayos de especies de oxígeno reactivo y determinar la relación de esto con la disminución de la viabilidad celular. Dada la posibilidad de sus múltiples aplicaciones en odontología también se sugiere realizar estudios sobre diferentes cultivos celulares.

10. Conclusiones

El método de mecano-síntesis es un método amigable con el ambiente, simple y económico para sintetizar MgO-NPs homogéneas en poco tiempo y sin grandes variaciones entre lotes, con dimensiones menores a los 100 μm lo cual es consistente con lo reportado en la literatura.

Los ensayos revelaron que a tiempos cortos las MgO-NPs producen citotoxicidad en las células de hueso, por lo que su aplicación directa podría ser perjudicial en este tejido.

Sin embargo, dadas las imitaciones del estudio es necesario realizar lecturas a mayor tiempo, y modificar variantes de este para determinar el efecto de las MgO NPs en células de hueso, o bien dirigir la línea de investigación a la aplicación de estas como nanocompuestos en materiales inertes en odontología mediante los cuales se pueda aprovechar la capacidad antibacteriana de las NPs.

A través de la investigación continua en el área clínica, las MgO NPs han aportado resultados positivos sobre el uso de este tipo de NPs. Este tipo de NPs poseen características como peso molecular, pH, fuerzas iónicas, tamaño de partículas, etc., mismas que se pueden modificar con procesos sintéticos de producción, por lo tanto, han sido exploradas para desarrollo de nano-criocirugía, hipertermia, inhibición tumoral, e incluso imagenología para tumores cerebrales.

Sin embargo, su estudio para aplicaciones en odontología sigue siendo escaso, por lo que investigaciones, como la presentada en este trabajo, contribuyen al conocimiento existente respecto a la aplicación de MgO NPs, y al desarrollo de nuevos productos para su aplicación odontológica.

11. Referencias Bibliográficas

1. Moya, MTF., Díaz, MJ., Lobo, M., García, J., y Capó, M. (2011). Nanotoxicología ambiental: retos actuales. *Medicina balear*, 26(2), 36-46. [https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=84680]
2. Rudramurthy, G. R., & Swamy, M. K. (2018). Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: An update. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(8), 1185-1204. https://link.springer.com/article/10.1007/s00775-018-1600-6
3. Kim Y, Kim D, Yu K, Seo H, Lee S, Casel M et al. Development of Spike Receptor-Binding Domain Nanoparticles as a Vaccine Candidate against SARS-CoV-2 Infection in Ferrets. *mBio*. 2021;12(2). https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.00230-21?permanently=true&
4. Urrejola, MC., Soto, LV., Zumarán, CC., Peñaloza, JP., Álvarez, B., Fuentesvilla, I., y Haidar, Z. S. (2018). Sistemas de nanopartículas poliméricas i: de biodetección y monitoreo de glucosa en diabetes a bioimagen, nano-oncología, terapia génica, ingeniería de tejidos/regeneración a nano-odontología. *International Journal of Morphology*, 36(4), 1490-1499.
5. Sharan, J., Singh, S., Lale, S. V., Mishra, M., Koul, V., y Kharbanda, O. P. Applications of Nanomaterials in Dental Science: A Review. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, (2017), Vol 17(4), 2235–2255. doi:10.1166/jnn.2017.13885
6. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. (1997) PubMed https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23115811/
7. HF de Baaij, Jeroen, GJ Hoenderop, Joost, JM Bindels, René. (2015). Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev*. Jan;95(1):1-46. PubMed. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25540137/
- 8.

9. Soria M. (2013) Magnesio, el electrolito olvidado. [Zaragoza]: Prensas de la Universidad de Zaragoza; https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=bDUVDMCsi50C&oi=fnd&pg=PA10&dq=magnesio+en+medicina&ots=0Zdp2hgvbt&sig=MTjVsfYIddX-tNh6h4kQwz_hwJ0&redir_esc=y#v=onepage&q=magnesio%20en%20medicina&f=false
10. Méndez Agreda G. (2013) Evaluación del riesgo por toxicidad crónica a la exposición de magnesio a nivel renal en ratas de la especie *Rattus norvegicus* [pregrado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/4992>
11. Krishnamoorthy K, Manivannan G, Kim S, Jeyasubramanian K, Premanathan M. (2012) Antibacterial activity of MgO nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy. *Journal of Nanoparticle*;14(9). <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-012-1063-6>
12. Vázquez-Olmos, AR., Vega-Jiménez, AL., y Paz-Díaz, B. (2018). Mecanosíntesis y efecto antimicrobiano de óxidos metálicos nanoestructurados. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 11(21), 29-44.
13. Zavaleta, H.A., Vilchis, A.R., López, L.M., Arenas, J., Hanako, G. y Crosby, M.M. (2018) La nanociencia y la nanotecnología: Herramientas para medir lo diminuto. 6(4). Disponible en: <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/468>
14. Ealia, SAM., y Saravanakumar, MP. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 263, No. 3, p. 032019). IOP Publishing. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/263/3/032019/pdf>

15. Behzadi, E., Sarsharzadeh, R., Nouri, M., et al. Albumin binding and anticancer effect of magnesium oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2018;14:257-270. Published 2018 Dec 27. doi:10.2147/IJN.S186428
16. Imani, M.M., Safaei, M. Optimized Synthesis of Magnesium Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents, *Journal of Nanotechnology*, 2019 ID 6063832, 6 páginas.

Anexo

