

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SUSTITUTOS ÓSEOS BASADOS EN  
HIDROXIAPATITA, NANOPARTÍCULAS DE PLATA E IMMUNEPOTENT-CRP**

**POR**


**M.C JUAN JOSÉ MARTÍNEZ SANMIGUEL**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

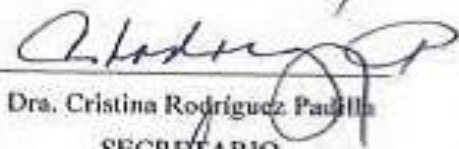
**MARZO 2020**

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SUSTITUTOS ÓSEOS BASADOS EN  
HIDROXIAPATITA, NANOPARTÍCULAS DE PLATA E IMMUNEPOTENT-CRP

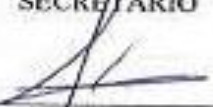
COMITÉ DE TESIS

  
Dra. Diana Ghette Zarate Triviño

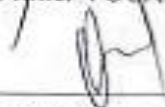
PRESIDENTE

  
Dra. Cristina Rodríguez Paulillo

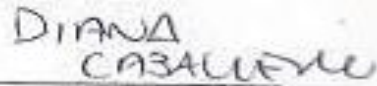
SECRETARIO

  
Dr. Sergio Galindo Rodríguez


Primer VOGAL

  
Dr. Moisés Armides Franco Molina

Segundo VOCAL

  
Dra. Diana Caballero Hernández

Tercer VOCAL

  
Dr. René Hernández Delgadillo

Asesor externo

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SUSTITUTOS ÓSEOS BASADOS EN  
HIDROXIAPATITA, NANOPARTÍCULAS DE PLATA E IMMUNEPOTENT-CRP

Dirección de tesis

---

Dra. Diana Ginette Zárate Triviño

Directora

---

Dr. Rene Hernández Delgadillo

Asesor externo

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios. A la Subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme formar parte de su matrícula.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Especialmente a la Dra. María Cristina Rodríguez Padilla por brindar el apoyo necesario para realizar este trabajo.

Un agradecimiento muy especial por las oportunidades brindadas, a mi asesora de tesis, Dra. Diana Ginette Zarate Triviño, su motivación, esfuerzo, dedicación, sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia y paciencia han sido fundamentales para mi formación.

A mi comité de tesis Dr. Moisés A. Franco, Dr. Rene Hernández, Dra. Diana Caballero y Dr. Sergio Galindo. les agradezco por su colaboración para la culminación de este trabajo.

A mi familia que siempre me han apoyado, guiado y cuidado con mucho amor. Gracias de corazón por todas las oportunidades que me han brindado.

A Mayra A. Meléndez, agradecido contigo por llenarme de alegría, de amor, de ternura y de todo lo bueno que hay en tu corazón.

A mis amigos de laboratorio, Sara, Mague, Edelin, Teo, Raúl, Paulina, Uriel, Bruno que siempre estuvieron para ayudarme, aconsejarme y en muchas ocasiones guiarme.

A mis amigos de generación del LIV y otras orientaciones.

¡A todos ustedes muchas gracias!

## DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a mi familia, que gracias a su apoyo pude concluir y obtener el grado de Doctor. A mis padres y hermanos por su apoyo y confianza. Gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y estudiante.

Y otra dedicatoria especial para mi sobrino Elías, puede que no tengas mis ojos o mi sonrisa, pero sobrino, desde el primer momento, tuviste mi corazón.

## INDICE

Índice de tablas .....	I
Índice de figuras .....	I
Lista de símbolos y abreviaturas .....	III
RESUMEN .....	IV
ABSTRACT .....	V
INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	4
Histología del hueso .....	4
Propiedades mecánicas del tejido óseo .....	6
Estrategias para la reparación de tejidos .....	7
Injertos .....	7
Conexiones anatomofuncionales entre el sistema immune y el tejido óseo .....	8
Fisiología de la remodelación ósea .....	9
Osteoblastos .....	10
Nanotecnología .....	12
Nanopartículas de plata .....	13
Hidroxiapatita .....	16
Bioactividad .....	18
IMMUNEPOTENT-CRP .....	19
Ingeniería de tejidos .....	20
JUSTIFICACIÓN .....	22
HIPÓTESIS .....	23
OBJETIVO GENERAL .....	24
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	24
METODOLOGÍA .....	25
Síntesis de partículas de hidroxiapatita con nanopartículas de plata (HA/Ag) .....	25
Caracterización de partículas de HA/Ag .....	26

Difracción Laser.....	26
Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR).....	26
Difracción de rayos X (DRX).....	26
Microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	26
Espectroscopia de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) .....	27
Espectroscopía Fotoeléctrica de rayos X (XPS).....	27
Ensayo de actividad citotóxica de nanopartículas de HA/Ag .....	27
Evaluación genotóxica de partículas de HA/Ag por ensayo cometa. ....	28
Ensayo de bioactividad en fluido corporal simulado .....	28
Ensayo de liberación de calcio de los polvos de HA/Ag .....	29
Actividad antimicrobiana .....	30
Estimación de los niveles de endotoxina.....	31
Actividad antioxidante .....	31
Efecto en la producción de citocinas pro-inflamatorias .....	32
Identificación de proteínas específicas en la regeneración ósea.....	33
Ensayo de hinchamiento <i>in vitro</i> .....	33
Ensayo de degradación <i>in vitro</i> .....	34
Ensayo de regeneración en un modelo <i>in vivo</i> .....	34
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
Síntesis y caracterización .....	37
Bioactividad.....	41
Liberación de Ca <sup>2+</sup> .....	42
Efecto citotóxico y genotóxico .....	43
Mineralización .....	45
Detección de proteínas asociadas a la regeneración ósea .....	45
Actividad antimicrobiana de HA/Ag .....	48
Capacidad antiinflamatoria de los nanocompuestos .....	48
Hinchamiento y degradación de los nanocompuestos .....	52
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>55</b>

CONCLUSIONES ..... 60

BIBLIOGRAFÍA ..... 61



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Energía de enlace (BE) de los elementos presentes en el espectro de XPS.....	39
Tabla 2	Análisis elemental de HA/Ag por ICP-OES.....	40
	Porcentaje atómico y relación Ca/P en la superficie de la muestra de HA/Ag por EDS.....	41
Tabla 3	Detección de endotoxina en muestras de HA/Ag.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Fases del tejido óseo a nivel microscópico.....	5
Figura 2	Vía de señalización TGF- $\beta$ .....	11
Figura 3	Señales moleculares que desempeñan un papel en la diferenciación y activación osteoblástica.....	12
Figura 4	Ejemplo de formación de apatita sobre una superficie de biovidrio.....	18
Figura 5	Esquema de reacción para la síntesis de partículas de HA/Ag.....	24
Figura 6	Esquema del modelo de regeneración <i>in vivo</i> .....	35
Figura 7	Caracterización de polvos de HA/Ag (a,b) microscopía electrónica de barrido (SEM) (c) Difracción laser (d) espectroscopia de energía dispersa.....	36
Figura 8	Mapeo de polvos de Ha/Ag por EDS.....	37
Figura 9	Espectro de FT-IR de polvos de hidroxiapatita/plata.....	37
Figura 10	Patrón de difracción de rayos X de los polvos de HA/Ag.....	38
Figura 11	Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) para los polvos de HA/Ag.....	39
Figura 12	Microscopía electrónica de barrido y difracción de rayos X de las partículas HA/Ag después del proceso de bioactividad en SBF. a) 1 día b) 7 días c) 14 días d) 21 días.....	41
Figura 13	Liberación de calcio de partículas de HA con y sin Ag (a) y su efecto en la producción de Runx2 (b).....	42

	Ensayo de viabilidad y genotoxicidad en células MG-63 (a-b) y	43
Figura 14	MC3T3-E1 (c-d).....	43
Figura 15	Ensayo de viabilidad de ICRP en células MG-63 (a) y MC3T3-E1 (b).	45
Figura 16	Efecto HA/Ag y HA/Ag-ICRP en la mineralización de la matriz extracelular de células MG-63.....	46
Figura 17	Efecto de los nanocompuestos en la expresión del factor de transcripción Runx2.....	46
Figura 18	Efecto los nanocompuestos en la expresión de Osteocalcina (a) y TGF- $\beta$ (b).....	47
Figura 19	Figura 19. Actividad antimicrobiana de las partículas de HA/Ag contra <i>E.coli</i> , MRSA y <i>C. albicans</i> .....	49
Figura 20	Efecto en la inhibición de óxido nítrico de las partículas de HA/Ag e ICRP en células MG-63.....	50
Figura 21	Nanocompuestos modulan la producción de citocinas proinflamatorias en células MG-63 estimuladas con LPS.....	51
Figura 22	Porcentaje de hinchamiento de películas de Qts, Qts-ICRP y Qts- ICRP-HA/Ag.....	52
Figura 23	Porcentaje de degradación de películas de Qts, Qts-ICRP y Qts-ICRP- HA/Ag.....	52
Figura 24	Proceso de colocación de injerto de Qts-ICRP-HA/Ag.....	53
Figura 25	Análisis histológico del proceso de regeneración en un modelo de rata	

## **Lista de símbolos y abreviaturas**

HA/Ag.- Hidroxiapatita/Plata

FT-IR.- Espectro de Infrarrojo por transformada de Fourier

DRX.- Difracción de rayos X

ICP.- Plasma de acoplamiento inductivo

XPS.- Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X

## RESUMEN

La reconstrucción de defectos del complejo craneomaxilofacial es un desafío clínico actual en odontología. Las técnicas comúnmente empleadas para regenerar y reparar el tejido óseo dañado presentan grandes limitaciones cuando su capacidad de auto regeneración es superada por el grado de lesión. Esta problemática se puede relacionar con diferentes parámetros: el rechazo inmunológico, las complicaciones de una intervención quirúrgica, incapacidad del injerto de proporcionar una recuperación total de la funcionalidad del tejido y un elevado costo económico. La ingeniería tisular, busca complementar esas técnicas y solucionar sus inconvenientes empleando biomateriales híbridos como soportes celulares. Los biomateriales híbridos están formados por la combinación de dos o más materiales de distinta naturaleza, buscan incrementar las propiedades que cada uno de estos posee de manera individual, que se traduce en una mayor actividad. La hidroxiapatita (HA) es un mineral formado por fosfato de calcio, su composición química es similar a la matriz inorgánica del hueso y exhibe alta afinidad por los tejidos duros del huésped a través de unión química. La HA se caracteriza por ser biocompatible, bioactiva, osteoconductiva, no inflamatoria, no inmunogénica y no tóxica. Al añadir un componente antimicrobiano a los biomateriales como las nanopartículas de plata con reportes de actividad osteogénica hace posible extender su funcionalidad principalmente en aquellas zonas que son susceptibles a infecciones. El sistema inmunológico juega un rol importante en la regeneración ósea, se ha demostrado que extractos dializados de leucocitos de bazo bovinos (IMMUNEPOTEN-CRP) puede disminuir la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6, muestra propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes. El equilibrio homeostático del sistema inmunológico favorece la diferenciación y activación de la osteoblastogénesis.

En el presente trabajo se desarrolló un hidrogel como biomaterial inyectable para cavidades óseas cargados con partículas bioactivas de HA, nanopartículas de plata e IMMUNEPOTENT-CRP para regular una reacción inmunológica que induzca la diferenciación y proliferación osteoblástica favoreciendo la regeneración del tejido óseo dañado.

## ABSTRACT

The reconstruction of craniomaxillofacial complex defects is a real clinical challenge in dentistry. The specific techniques used to regenerate, and repair damaged bone tissue have great limitations when their capacity for self-regeneration is overcome by the degree of injury. This problem can be related to different parameters: immunological rejection, complications of a surgical intervention, inability of the injector to provide a total recovery of tissue functionality and a high economic cost. Tissue engineering investigates complementary techniques and solutions for its disadvantages using hybrid biomaterials as cellular supports. The hybrid biomaterials are formed by the combination of two or more materials of different nature, they look for the properties of each of these possesses individually, which translates into a greater activity. Hydroxyapatite (HA) is a mineral formed by calcium phosphate, its chemical composition is like the inorganic matrix of the bone and exhibits high affinity for the hard tissues of the host through chemical binding. HA is characterized by being biocompatible, bioactive, osteoconductive, non-inflammatory, non-immunogenic and non-toxic.

By adding an antimicrobial component to biomaterials such as silver nanoparticles with reports of osteogenic activity, its functionality can be extended mainly in areas that are susceptible to infections. The immune system plays an important role in bone regeneration, it has been demonstrated that dialyzed extracts of bovine spleen leukocytes (IMMUNEPOTEN-CRP) can decrease the production of TNF- $\alpha$  and IL-6, also shows anti-inflammatory and antioxidant properties. The homeostatic balance of the immune system will favor the differentiation and activation of osteoblastogenesis.

In the present work a hydrogel we developed an injectable biomaterial for bone cavities loaded with bioactive particles of HA, silver nanoparticles and IMMUNEPOTENT-CRP to regulate an immunological reaction that induces osteoblast differentiation and proliferation favoring the regeneration of damaged bone tissue.

## INTRODUCCIÓN

En la práctica odontológica es frecuente encontrar pacientes que han perdido tejido óseo por diversos motivos, principalmente debido al proceso natural de reabsorción ósea posterior a la pérdida de piezas dentarias, o producto de la destrucción de tejido a causa de la enfermedad periodontal, la cual es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la pérdida de soporte alrededor del diente, padecida por gran parte de la población adulta (Sowmya, Kumar et al. 2011). Además, existen otras condiciones que implican pérdida ósea en la región maxilofacial, tales como defectos causados por traumatismos, defectos congénitos como paladar fisurado y enfermedades adquiridas como cáncer (Kaigler and Mooney 2001).

Hoy en día, mantener la integridad y el contorno del reborde óseo es un aspecto relevante para la futura rehabilitación de los pacientes (Ashman 2000). Por lo que sólo la intervención terapéutica es capaz de inducir su regeneración para poder restaurar la forma y función de las estructuras perdidas (Aichelmann-Reidy and Reynolds 2008).

El hueso humano es un tejido dinámico, altamente vascularizado, con la habilidad de remodelarse a lo largo de la vida a través de la formación de nuevo tejido por parte de células osteoblásticas, y la resorción ósea, producida por células osteoclasticas (Cortizo, Molinuevo et al. 2006). Estos procesos están regulados por una variedad de agentes, tanto locales como sistémicos (Marie, Ammann et al. 2001), incluyendo factores de crecimiento, hormonas y estrés (Yamaguchi 1998). Los tres elementos esenciales en regeneración ósea son osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción (Giannoudis, Dinopoulos et al. 2005). La osteogénesis es el proceso de formación de nuevo hueso a partir de células osteoprogenitoras presentes dentro del material de injerto. La osteoinducción es la capacidad de un material de estimular y activar las células osteoprogenitoras que se encuentran en los tejidos adyacentes a él. La osteoconducción es la facilitación y orientación de vasos sanguíneos y la creación de nuevo sistemas de Havers dentro del injerto óseo, el cual actúa como un andamio para la formación de hueso nuevo (Moore, Graves et al. 2001).

El principal componente inorgánico del hueso de los vertebrados es la hidroxiapatita (HA). La fase mineral del hueso está formada por cristales de calcio y fosfato, organizados en hidroxiapatita donde un 70% de la masa del hueso lo constituye este mineral, como biomaterial presenta propiedades como biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y unión directa al hueso (Ianeselli, Zhang et al. 2010). Los nanomateriales exhiben propiedades únicas de superficie (topografía, química, humectabilidad y energía de superficie), debido a un aumento significativo en el área superficial, rugosidad y energía superficial, lo cual se traduce en una mayor actividad, comparado con los materiales convencionales o microestructurados (Mendonça, Mendonça et al. 2008; Nayar, Bhuminathan et al. 2011).

Las nanopartículas de plata (NPsAg) se han estudiado ampliamente por sus propiedades antimicrobianas en comparación con varios antimicrobianos o actuando de forma sinérgica, proporcionando una amplia aplicabilidad en odontología evitando o disminuyendo la posibilidad de infección. Las nanopartículas de plata en tecnologías dirigidas a la salud bucal se han utilizado como agentes inorgánicos en nanocompuestos de base polimérica y recubrimientos de implantes mostrando actividad contra patógenos cariogénicos, biopelículas periodontales, patógenos fúngicos, bacterias endodónticas y cáncer oral. Al añadir un componente antimicrobiano a los biomateriales como las NPsAg con reportes de actividad osteogénica hace posible extender su funcionalidad principalmente en aquellas zonas que son susceptibles a infecciones (Ong, Lim et al. 2013; Marin, Mihail Vlasceanu et al. 2015; Zhang, Liu et al. 2016).

El sistema inmunológico juega un rol importante en la regeneración ósea. Altas concentraciones de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 son potentes inductores de la reabsorción ósea. El IMMUNOPOTENT-CRP es un dializado heterogéneo de sustancias de bajo peso molecular liberados por los leucocitos de sangre desintegrados o de tejido linfoide homogenizado de bazo bovino. Estudios recientes han demostrado efectos inmunomoduladores, antiinflamatorias y antioxidantes por tal motivo en este proyecto se estudió su actividad en biomateriales para la regeneración ósea con la finalidad de generar ambiente propicio para la actividad osteoblástica (Franco-Molina, Mendoza-Gamboa et al. 2005; Franco-Molina, Mendoza-Gamboa et al. 2011).

Con los avances de la medicina, nanotecnología e ingeniería de tejidos y la necesidad de realizar procedimientos reconstructivos óseos que demandan mayores exigencias en relación con la devolución de la estética y la funcionalidad perdida. En el presente estudio, se llevó a cabo el desarrollo de nanocompositos para la regeneración ósea a base de nanopartículas de plata, hidroxiapatita que sirven de fase inorgánica y el IMMUNOPOTENT-CRP como un modulador del sistema inmunológico para favorecer la actividad de osteoblástica. Esto podrá tener beneficios importantes en salud pública, logrando el acceso de la población a terapias que mejoren su calidad de vida en forma significativa.



## ANTECEDENTES

### Histología del hueso

El tejido óseo es un tipo de tejido conectivo especializado altamente vascularizado, compuesto por una fase inorgánica o mineral y una fase orgánica. Aunque sus propiedades varían a lo largo de su estructura este tejido se caracteriza por su rigidez y elevada resistencia a fuerzas tanto de tracción como de compresión. (Wheater and Young 2006)

La organización estructural a nivel macroscópico de este tejido es la que le aporta las propiedades mecánicas que tanto le caracterizan:

- Hueso cortical o compacto: Es el tejido que forma la carpa externa de los huesos, caracterizado por su dureza, fragilidad y alta densidad. Está formado longitudinalmente por osteonas, unas estructuras cilíndricas que envuelven los canales de Havers en los que se encuentran nervios, vasos sanguíneos y linfáticos. Estos canales se conectan entre si transversalmente gracias a los conductos de Volkmann.
- Hueso trabecular o esponjoso: Este tejido está localizado en la parte interna de los huesos, caracterizado por su elevada porosidad. Está formado por una red de delgadas prolongaciones óseas, llamadas trabéculas, que están orientadas de tal modo que el hueso pueda soportar esfuerzos de tracción y compresión. En los espacios de la red trabecular se encuentra la médula ósea roja, donde se produce la hematopoyesis (Eastoe, Hollamby et al. 2006).

A nivel microscópico el tejido óseo se diferencia en dos fases:

- Fase inorgánica o mineral: Alrededor del 65% en peso se corresponde a la fase inorgánica de este tipo de tejido constituido en su mayor parte por nanocristales de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (figura 1).
- Fase orgánica: El 30% en peso, aproximadamente, se corresponde a la fase orgánica del tejido óseo. Está formada principalmente de una matriz de colágeno

tipo I, en la que se disponen los cristales de hidroxapatita, que da lugar a las fibras que constituyen las estructuras a nivel macroscópico. Esta fase también está formada por la parte celular y una pequeña fracción de proteínas no colágenas.

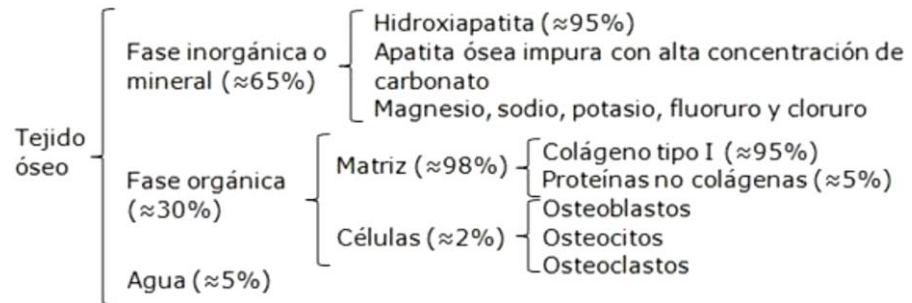


Figura. - 1 Fases del tejido óseo a nivel microscópico.

Aunque el tejido óseo no tiene un alto contenido celular es importante conocer la función que realizan, ya que son vitales para la correcta formación de estos tejidos. Las células óseas pueden clasificarse principalmente en: (Navarro Toro 2005).

- Osteoblastos: Estas células crean el tejido óseo, ya que son las que generan la matriz ósea. En el momento en que se encuentran rodeadas de matriz se mineralizan transformándose en osteocitos.
- Osteocitos: Son el resultado de la mineralización de la membrana de los osteoblastos al finalizar su función. Residen en la matriz ósea y son las que permiten que el hueso siga siendo un tejido vivo ya que se encargan de mantener el equilibrio entre las fases orgánica y orgánica.
- Osteoclastos: La continua regeneración del tejido óseo es posible gracias a la acción de estas células que se encargan de la reabsorción ósea y de activar la acción de los osteoblastos mediante marcadores celulares para la generación de nueva matriz ósea.

El tejido óseo cumple varias funciones en el organismo, tanto a nivel mecánico como biológico. Las funciones mecánicas principales son: (Comín M 1999).

- **Protección:** Gracias a las cavidades que forma la disposición de ciertos huesos se protegen los órganos vitales y tejidos blandos de los posibles traumatismos.
- **Estabilidad y movilidad:** El sistema músculo-esquelético (huesos, músculos, ligamentos y tendones) proporciona la estabilidad del cuerpo y permite su movimiento.

Algunas de las funciones biológicas que caracterizan el tejido óseo son las descritas a continuación:

- **Regulación y almacenamiento:** Este tejido regula el metabolismo de algunos iones ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{PO}^3$ ) y contiene la mayor reserva mineral del cuerpo, sobre todo de calcio y fósforo.
- **Hematopoyesis:** Como se ha comentado anteriormente, en el hueso esponjoso se localiza la médula ósea roja que fabrica las células sanguíneas.

### **Propiedades mecánicas del tejido óseo**

El hueso puede desempeñar sus funciones mecánicas resistiendo esfuerzos tanto de compresión como de tracción y de cizalladura debido a determinadas propiedades mecánicas. Cabe destacar que es un material natural anisotrópico, lo cual significa que según en qué dirección se analice se obtendrán unas propiedades u otras. También es importante tener en cuenta que, dependiendo del tiempo y de la velocidad en que se aplique la carga sobre el hueso, variarán sus propiedades mecánicas, ya que tiene un comportamiento viscoelástico (Barrere, Mahmood et al. 2008).

El equilibrio que existe en el tejido óseo, entre las fases inorgánica y orgánica, le proporcionan una combinación perfecta para soportar cargas de distintos tipos. La fase mineral se caracteriza por su elevada dureza y resistencia a esfuerzos de compresión y por su fragilidad a esfuerzos de tracción. Pero gracias a la fase orgánica, blanda y dúctil, el hueso puede soportar esfuerzos de tracción aportándole flexibilidad y elasticidad.

El tejido óseo se diferencia estructuralmente en dos tipos cada uno de ellos le provee de propiedades mecánicas diferentes.

En el hueso cortical, dado que los nanocristales de hidroxiapatita depositados en la matriz ósea se orientan cristalográficamente en dirección longitudinal, tiene una mayor resistencia tanto a la tracción como a la compresión en el eje longitudinal que en el eje transversal. El módulo de elasticidad también varía según la dirección en que se aplique la carga.

Las propiedades mecánicas referentes al hueso trabecular dependen tanto de su densidad que hace muy difícil su estudio y su rango de variación es muy extenso. A pesar de ello, ciertos ensayos han demostrado que su resistencia a la compresión es de 5-10 MPa y su módulo de elasticidad de 50-100 MPa (Li, Yang et al. 2014; Chen and Thouas 2015).

### **Estrategias para la reparación de tejidos**

El tejido óseo, gracias a su alta vascularización y a las células que lo forman, tiene una gran capacidad de regeneración. Tanto en la continua renovación durante su desarrollo como en respuesta a algún tipo de traumatismo o lesión. La regeneración del tejido óseo, al igual que cualquier otro tejido, no solo implica la reparación de su estructura sino también el restablecimiento de sus funciones a nivel bioquímico, metabólico y biomecánico (Barrere, Mahmood et al. 2008).

En ocasiones el nivel de defecto del tejido óseo supera su capacidad de autoregeneración debido al tamaño de la lesión como consecuencia de grandes fracturas, degeneración del tejido por osteoporosis o necrosis, infecciones, tumores, entre otros. Por ello existen diversas técnicas de reparación y regeneración ósea con las que se intenta alcanzar el máximo nivel de recuperación posible tanto de su estructura como de su funcionalidad.

Algunas de las técnicas de reparación y regeneración ósea existentes (Navarro Toro 2005; Barrere, Mahmood et al. 2008).

#### **Injertos**

Una de las técnicas más utilizadas en la regeneración del tejido óseo es la utilización de injertos, es decir, el reemplazo de un hueso o parte de él mediante un proceso quirúrgico

para reparar ciertos tipos de lesiones. Dichos injertos pueden clasificarse en tres grupos distintos en función de su origen.

- **Autoinjertos:** Se trata de un trasplante en el que se extrae un fragmento de hueso del propio individuo para luego implantárselo en el punto de la lesión. Aunque es el caso de injerto de más éxito debido a que no presenta rechazos inmunológicos produce ciertas desventajas a tener en cuenta. Al tener que realizar dos operaciones quirúrgicas el procedimiento se vuelve más costoso, más peligroso para el paciente por posibles infecciones y la rehabilitación resulta más larga y dolorosa. Además, la cantidad de tejido de la que se puede disponer es limitada.
- **Alloinjertos:** Este trasplante se diferencia de los autoinjertos en el donante, ya que en este caso el tejido proviene de un individuo humano diferente al paciente, generalmente de uno fallecido recientemente. Este tipo de injerto evita la segunda intervención quirúrgica, pero en su lugar presenta un posible rechazo inmunológico y transmisión de posibles patógenos (Reynolds, Aichelmann-Reidy et al. 2010).

Para intentar evitar estos efectos el tejido es sometido a diversos tratamientos antes de ser trasplantado. Además, sigue existiendo la limitación de la disponibilidad de un donante.

- **Xenoinjertos:** Se basa en trasplantar un fragmento de hueso de origen animal. Aunque con esta técnica no hay limitación en cuanto a la disponibilidad de tejido donante hay un gran inconveniente ya que existe un alto riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas y, obviamente, un alto riesgo de rechazo inmunológico (Bons, Lehmann et al. 2002; Sandor, Lindholm et al. 2003).

### **Conexiones anatomofuncionales entre el sistema inmune y el tejido óseo**

Existen múltiples contactos anatómicos y vasculares, así como diferentes mecanismos moleculares y celulares, que permiten la interacción permanente entre el tejido óseo y el sistema inmune, de tal forma que podemos considerarlos como un conjunto funcional integrado (sistema osteoinmune) (Geusens and Lems 2011). El hueso, en virtud de su estructura, se relaciona interiormente con la médula ósea, participando en la hematopoyesis y permitiendo la cooperación local de células óseas e inmunes, tanto a

nivel local como a distancia a través de vasos nutricios y periósticos, mientras que, a través de las entesis y el esqueleto yuxtaarticular, se conecta con estructuras decisivas en el proceso de destrucción articular que caracteriza a las enfermedades inflamatorias articulares crónicas.

Las células de ambos sistemas comparten orígenes comunes, ya que los osteoclastos (OC) proceden de células madre hematopoyéticas y comparten su linaje con los monocitos y los macrófagos, mientras que las células madre mesenquimales son las precursoras de los osteoblastos (OB), que, a su vez, desempeñan un papel central en la diferenciación de las células madre hematopoyéticas en los nichos adyacentes a la superficie endoóstica (Calvi, Adams et al. 2003). Algunas vías moleculares que participan en el remodelado, como la parathormona (PTH), las proteínas morfogenéticas del hueso y la vía Wnt, lo hacen también en la regulación de la hematopoyesis. Por otro lado, múltiples citocinas procedentes de linfocitos, células dendríticas y macrófagos, actúan sobre las células del remodelado óseo (RO), tanto en su vertiente resortiva, generalmente a través de la vía RANK/RANKL/OPG, como en su vertiente osteoformadora, directa o indirectamente a través de la señal Wnt (Monroe, McGee-Lawrence et al. 2012).

### **Fisiología de la remodelación ósea**

El RO se produce en lugares concretos llamados compartimentos de remodelado óseo, que están compuestos por un grupo funcional de células que actúan de forma coordinada, denominada unidad multicelular básica y que contiene OC, OB, osteocitos (OS), células de la superficie ósea («lining») y células de los capilares de soporte (Feng and McDonald 2011). El ciclo se estructura en 4 fases consecutivas, pero no simétricas ni de la misma duración, iniciándose con el reclutamiento de precursores de OC hacia un lugar de las superficies quiescentes, en la superficie trabecular o endoóstica o en la profundidad de una osteona. Los OC maduros activan su maquinaria resortiva y labran una laguna (laguna de Howship), que en la siguiente fase (fase de inversión) es «allanada» por la colaboración de células de estirpe macrofágica con las células del lining, lo que permite acudir a los OB maduros que rellenan la cavidad de osteoide. Finalmente, se produce la mineralización y la formación de hueso maduro (Heino and Hentunen 2008).

En ausencia de enfermedad, la diferencia entre el corto periodo de resorción y el largo periodo de formación (espacio de remodelado) no provoca consecuencias estructurales relevantes. Sin embargo, cuando existe un desequilibrio entre ambos procesos y se incrementa la frecuencia de activación de unidades de remodelado, como ocurre en la menopausia, el espacio de remodelado alcanza unas dimensiones considerables y puede provocar aumento de la fragilidad ósea (muchas lagunas abiertas, sin que haya finalizado el proceso de relleno osteoblástico).

En el esqueleto adulto normal hay unos 2 millones de sitios de remodelado que trabajan a una velocidad de 25  $\mu\text{m}$  por día y reemplazan un volumen óseo en cada micrositio de 0,025  $\text{mm}^3$ . El intervalo entre ciclos en la misma localización oscila entre 2 y 5 años y la tasa de remodelado del esqueleto completo es del 10% anual (3% en hueso cortical y 30% en el trabecular). La vida media de los OC es de 2 semanas y su destino final, en condiciones normales, es la apoptosis, mientras que la vida media de los OB activos es de 3 meses y su destino es triple, pues pueden sufrir apoptosis o quedar inactivos como células del lining o enterrados en la profundidad de la matriz mineralizada por ellos mismos fabricada, transformándose en OS (Mc Garrigle, Mullen et al. 2016).

### Osteoblastos

La formación ósea es dependiente del reclutamiento de un número suficiente de osteoblastos a las superficies que han sido sometidas al ataque de los osteoclastos. Proceden de un subgrupo de células madre mesenquimales con capacidad de diferenciación osteogénica. Aunque la localización exacta de estas células *in vivo* no se conoce, recientes estudios sugieren que podrían situarse en la superficie externa de los sinusoides medulares y que alcanzarían las superficies óseas a través de canales vasculares en respuesta a señales procedentes de los sitios de remodelado, bien de la matriz reabsorbida o de los propios OC activos. Una vez situados en la superficie ósea, los OB producen la matriz orgánica (osteoides) y finalmente mueren por apoptosis o son «enterrados» en la matriz calcificada, transformándose en OS (Marie and Kassem 2011). Numerosos factores sistémicos y locales regulan la proliferación, diferenciación y metabolismo de los osteoblastos, mediante mecanismos moleculares poco entendidos. Entre ellos se encuentran hormonas, como la 1,25 dihidroxivitamina D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) y

la hormona paratiroidea (PTH), y las citocinas como las interleucinas (IL) 6 y 11, las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y los factores transformantes del crecimiento beta (TGF- $\beta$ s) (Chen, Deng et al. 2012).

El TGF- $\beta$  forma parte de una superfamilia de más de 40 miembros donde también se incluye a las proteínas morfogénicas óseas (BMPs). La señalización de TGF- $\beta$  se transmite a través de la membrana plasmática por la formación de complejos específicos heteroméricos de tipo I y tipo II serina/treonina kinasa. La estimulación autocrina y paracrina por el TGF- $\beta$  es importante en el mantenimiento y la expansión de las células progenitoras mesenquimales. Huesos y el cartílago contienen cantidades de TGF- $\beta$  y células diana para la actividad TGF- $\beta$ . Promueve la proliferación y diferenciación del linaje osteoblastico a través de las vías MAPK y Smad2/3, y la activación del factor de transcripción Runx2 (Fig. 2) (Chen, Deng et al. 2012).

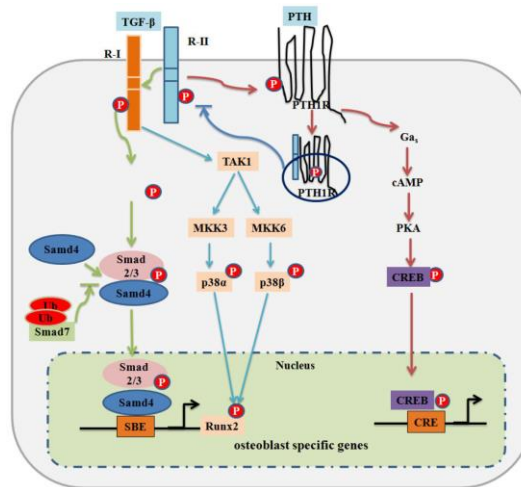


Figura 2.- Vía de señalización TGF- $\beta$ .

El regulador máster de la diferenciación osteoblástica es Runx2, marcador que se expresa de manera temprana en este linaje celular (Baek and Kim 2010). Es un factor necesario, pero no suficiente, para que una célula progenitora se diferencie (fig. 3). Además, es imprescindible para que se produzca tanto la osificación endocondral como la intramembranosa, ya que los ratones nulicigóticos para Runx2 no forman hueso mineralizado en ninguna región del esqueleto y carecen de OB así como de fosfatasa alcalina, osteopontina y osteocalcina. En un estadio más avanzado de diferenciación



intervienen otros factores, aunque los más relevantes son PTH/PTHrp, GH/IGF-1 (que desempeña un papel muy destacado en el mantenimiento de la masa muscular y ósea, y en el envejecimiento), la gran familia de las BMP (Chen, Deng et al. 2012) (que pertenecen a la superfamilia del TGF- $\beta$  y son los factores osteogénicos más potentes que se conocen en la actualidad) y la vía Wnt. En clínica, la BMP2 y la BMP7 se utilizan, a nivel local, en fusión espinal y en defectos de unión de los huesos largos, respectivamente (Higashi, Sukhanov et al. 2012).

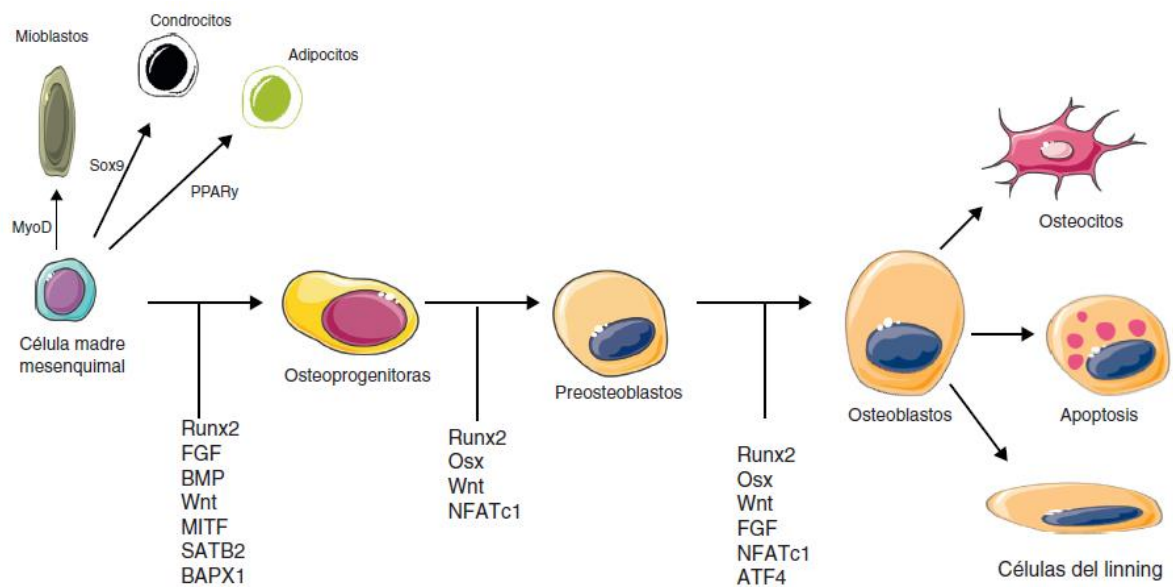


Figura 3.- Señales moleculares que desempeñan un papel clave en la diferenciación y activación osteoblástica.

### Nanotecnología

La nanotecnología se define como “la creación de materiales, dispositivos y sistemas funcionales a través del control de la materia en la escala nanométrica (1-100 nm), y explotación de nuevos fenómenos y propiedades (físicas, químicas y biológicas) a esa escala (Mendonça, Mendonça et al. 2008). Los nanomateriales exhiben propiedades únicas de superficie (topografía, química, humectabilidad y energía de superficie), debido

a un aumento significativo en el área superficial, rugosidad y energía superficial, lo cual se traduce en una mayor reactividad, comparado con los materiales convencionales o microestructurados. La nanotecnología está siendo explorada en múltiples ámbitos biomédicos. Las propiedades de superficie median la adsorción específica de proteínas y la bioactividad celular, regulando el comportamiento celular y dictando la regeneración de tejidos. Estudios previos han demostrado que los materiales nanoestructurados con propiedades de superficie favorables pueden promover mayor cantidad de interacciones específicas de proteínas para estimular de manera más eficiente el crecimiento de nuevo hueso, en comparación con los materiales convencionales. Todos estos mecanismos son clave para comprender por qué los nanomateriales tendrían propiedades superiores en relación a los materiales microestructurados para estimular la regeneración ósea (Nayar, Bhuminathan et al. 2011).

### **Nanopartículas de plata**

Las nanopartículas de plata (NPsAg) se han estudiado ampliamente por sus propiedades antimicrobianas en comparación con varios antimicrobianos actúan de forma sinérgica proporcionando una amplia aplicabilidad en odontología evitando o disminuyendo la posibilidad de infección. Las NPsAg se han utilizado en tecnologías dirigidas a la salud bucal como agentes inorgánicos en nanocompuestos de base polimérica y recubrimientos de implantes mostrando actividad contra patógenos cariogénicos, biopelículas periodontales, patógenos fúngicos, bacterias endodónticas y cáncer oral (Ong, Lim et al. 2013).

También han mostrado tener un amplio espectro contra bacterias grampositivas y gramnegativas virus y hongos. De todos los metales antimicrobianos la plata tiene la mayor eficiencia a bajas concentraciones en donde no tiene efectos tóxicos en células de mamíferos (Zhang, Liu et al. 2016). Además, los microorganismos tienen poca capacidad de desarrollar inmunidad a la plata, por lo tanto, es ampliamente utilizado para disminuir el crecimiento de microorganismos, en medicina (tratamiento de quemaduras, catéteres,

recubrimiento de implantes) y otros campos (Silver 2003; Marin, Mihail Vlasceanu et al. 2015).

Es indispensable que la regeneración ósea sea de un volumen adecuado para restaurar la estética maxilofacial y funciones musculoesqueléticas. Los defectos óseos pueden ocurrir como consecuencia de una lesión, cáncer e inflamación etc (Lu, Liu et al. 2016).

Una causa importante de defectos óseos son las infecciones bacterianas crónicas, como la periodontitis y peri-implantitis, enfermedades inflamatorias en la encía y hueso que rodea el diente natural y el implante generando una pérdida de hueso. La prevalencia de periodontitis severa con bolsas de 6 mm de profundidad es de un 10-15% (Petersen and Ogawa 2012) en adultos y la tasa de incidencia de peri-implantitis es del 8.6% al 9.7% después de 5 años (Pjetursson, Tan et al. 2004; Jung, Pjetursson et al. 2008) y mayor al 14% después de 10 a 15 años (Norowski Jr and Bumgardner 2009). La inflamación de la mucosa progresa más en la peri-implantitis que, en la periodontitis, además la lesión inflamatoria de la peri-implantitis se extiende más rápidamente hacia la medula ósea, por lo tanto, la progresión de la pérdida ósea es en mayor medida que en la periodontitis (Ericsson, Berglundh et al. 1992).

El tratamiento estándar para los defectos óseos infectados es la eliminación de la sección necrótica, administración local y/o sistémica de antibióticos y una reconstrucción de los defectos óseos por injertos de hueso. En estos casos la rehabilitación es más prolongada principalmente por la dificultad de control de infecciones. Las bacterias adheridas a un implante pueden convertirse en una fuente potencial de infección del tejido circundante (Riool, de Boer et al. 2014). Los antibióticos más comunes para el tratamiento de infecciones óseas son la tetraciclina y vancomicina, sin embargo, el tratamiento con antibióticos tiene varios inconvenientes como la potencial toxicidad sistémica y pobre penetración a los tejidos necróticos en el sitio de la herida, a largo plazo la administración local de antibióticos puede causar resistencia (Lewis, Supronowicz et al. 2012). Es importante el desarrollo de un método eficaz que al mismo tiempo pueda erradicar la infección y promover la formación de hueso nuevo.

En la última década, se han desarrollado nuevos biomateriales con propiedades antibacterianas y osteoinductoras para proporcionar una opción viable para la

regeneración de defectos óseos infectados (Zheng, Yin et al. 2010; Wang, Wang et al. 2011; Li, Xu et al. 2013).

Las nanopartículas de platas son un grupo de átomos de iones plata con un diámetro de 1 a 100 nm. Las NPsAg son interesantes para aplicaciones médicas debido a sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias por ser biocompatible y favorece la curación de heridas, en comparación con la alta toxicidad de los iones de plata, las NPsAg tienen una mayor área de superficie contra las bacterias y lo más importante menor toxicidad para los humanos. Se ha reportado concentraciones mínimas inhibitorias de NPsAg de 0.35 ng/ml para *Escherichia coli* y 3.5 ng/ml para *Staphylococcus aureus* (Kim, Kuk et al. 2007). Las propiedades antimicrobianas pueden atribuirse a los diferentes mecanismos como daño en la membrana bacteriana, la inhibición de la replicación del DNA síntesis proteica y actividad enzimática y una alteración de la respiración celular. Por lo que la resistencia antimicrobiana es extremadamente rara esto sugiere que los múltiples mecanismos bactericidas actúan en sinergia. Esta propiedad le confiere a las NPsAg la capacidad de eliminar las biopelículas formada por bacterias resistentes a los antibióticos (Silver 2003).

Por otro lado, si se aplica la concentración adecuada puede promover la actividad osteogénica. Quin et al. Reportó el efecto osteogénico de las NPsAg en células mesenquimales de origen urinario, ellos demostraron que 4 ug/ml de NPsAg y 2ug/ml del NO<sub>3</sub>Ag no afectaron la viabilidad celular. Los 4 ug/ml de nanopartículas de plata se asociaron a un aumento en la actividad de ALP y en la mineralización extracelular mientras que los 2 ug/ml de NO<sub>3</sub>Ag no mostró un efecto. Así mismo las nanopartículas de plata aumentaron la expresión de mRNA de Runx2, ALP, BMP2, colageno 1, OCN y Osteoponina expuestas por 7 14 y 21 días en comparación de los controles en contraste del efecto del nitrato de plata no fue visible (Qin, Zhu et al. 2014). Mahmood et al. Reportó nanomateriales con NPsAg que promover la mineralización en células MC3T3-E1 mediante un aumento en la expresión de genes osteogénicos (Mahmood, Li et al. 2011).

## **Hidroxiapatita**

La hidroxiapatita (HA), es una cerámica bioactiva. Entendiendo como material bioactivo aquel que puede inducir una actividad biológica específica. En ingeniería tisular ósea; aquel material que sumergido en suero induce la formación de hidroxiapatita natural (Götz, Müller et al. 2004).

HA es un componente natural del hueso, la hidroxiapatita sintética implantada en el organismo es utilizada por el mismo para la síntesis de HA natural. Con la fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$  es el fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes para tratamiento de tejido óseo, por ser el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos. La diferencia principal entre la hidroxiapatita sintética y la presente en el hueso es la ausencia de impurezas en la estructura de la HA sintética, principalmente, iones de carbonato y magnesio (Jin, Takita et al. 2000).

Presenta buenas propiedades como biomaterial tales como biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y unión directa al hueso (Ianeselli, Zhang et al. 2010). La hidroxiapatita se comenzó a utilizar en aplicaciones clínicas en 1981, como un granulado para relleno de lesiones periodontales. Se continuaron los estudios obteniéndose datos favorables, ausencia de toxicidad, de respuesta inflamatoria, de formación fibrosa, y la habilidad de unirse al hueso directamente (Parhi, Golas et al. 2009; Tagaya, Ikoma et al. 2011). Estudios experimentales a largo plazo confirmaron su biocompatibilidad, lo que llevó a considerar las cerámicas fosfocálcicas los materiales más compatibles, en cuanto a la respuesta del hueso al implante. El seguimiento a largo plazo en aplicaciones clínicas ha confirmado estos estudios. La capacidad osteoconductor de la HA, se debe a que el material puede proporcionar el entramado que facilite la penetración del nuevo hueso en el implante. Un material osteoconductor, puede llegar a ser osteointegrado si se llega a formar una unión físico-química entre el implante y el hueso vivo a partir del crecimiento óseo. Para ello se requieren áreas de íntimo contacto, estabilidad primaria y material bioactivo y compatible con el hueso (Vroman and Adams 1969).

Se encuentran gran cantidad de investigaciones basadas en este componente, centradas en el desarrollo de métodos de conformado para obtener materiales con diversas características morfológicas, estudios de porosidad, característica que influye en la

integración con el hueso, pero no se encuentran estudios comparativos de características texturales que influyan en su aplicación en ingeniería tisular.

En la actualidad, aunque existen hidroxiapatitas comerciales, no ofrecen una homogeneidad adecuada. Entre dos lotes distintos de producto se encuentran grandes diferencias en cuanto a características de tamaño de partículas y superficie específica. Además, otro problema con estas cerámicas comercializadas es que poseen una porosidad y propiedades mecánicas estandarizadas y por tanto, no pueden ser adaptadas a aplicaciones específicas (Turbill, Beugeling et al. 1996).

Las unidades funcionales básicas de células y tejidos están definidas en la escala nanométrica. El hueso es un compuesto cerámico natural formado por fibras colágenas que contienen nanocristales inorgánicos de hidroxiapatita, cuyo tamaño varía entre los 25-50 nanómetros de largo (Zhou and Lee 2011). Estos cristales se forman en una matriz orgánica y tienen uniones cristal-cristal débiles, por lo tanto, la reabsorción mediada por osteoclastos es homogénea. HA micrométrica al contrario, presenta menor área superficial y uniones cristal-cristal fuertes, es altamente estable, y en consecuencia, menos bioreabsorbible, lo cual constituye una característica indeseable, retrasando la tasa de regeneración ósea al ser utilizada como sustituto de hueso (Kivrak and Taş 1998) Por estas razones, el mineral óseo presenta mayor bioactividad que HA sintética (Kim 2003). HA nanométrica (nHA) presenta morfología, tamaño y cristalinidad comparable con aquellas apatitas que constituyen los tejidos duros humanos. La liberación de iones  $Ca^{2+}$  de nHA es similar a la de apatita ósea y significativamente más rápida que la de la apatita convencional (micro-HA) (Murugan and Ramakrishna 2004). Se ha registrado que el proceso de reabsorción de HA sintética (forma convencional) es diferente al del mineral óseo. Otras publicaciones han concluido que la bioreabsorción in vitro de nHA es mayor que la de HA convencional, por tanto, más cercana a la de la apatita biológica En relación a las propiedades mecánicas, se ha demostrado que nHA posee sinterabilidad mejorada y densificación aumentada debido a su mayor área de superficie, lo que podría mejorar su resistencia a la fractura como también otras propiedades (Fathi, Hanifi et al. 2008).

Una de las principales propiedades de la hidroxiapatita es la capacidad de sustitución iónica. La localización de los grupos hidroxilo pueden ser ocupados por iones similares

en tamaño y carga como  $\text{Cl}^-$  o  $\text{F}^-$ . y la localización de los iones fosfatos poder ser sustituidos por  $\text{BO}_3^{3-}$  y la localización de los cationes de calcio pueden ser intercambiados por  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Sr}^{2+}$  (Palcevskis, Dindune et al. 2011; Aina, Lusvardi et al. 2012). Esta capacidad de intercambio iónico es usada recientemente en la ingeniería de biomateriales. La introducción de pequeñas cantidades de algunos iones puede causar cambios o mejoras en los procesos biológicos fisicoquímicos, o propiedades mecánicas (Shepherd, Shepherd et al. 2012; Noor 2013). Como el  $\text{Mn}^{2+}$  que favorecieron la proliferación e incremento su biocompatibilidad en osteoblastos humanos SAOS-2 (Palcevskis, Dindune et al. 2011).

Durante la síntesis de HA/Ag diferentes concentraciones de plata pueden ser agregadas, desde 0.1% a 10% de peso. Concentraciones de 0.2% de plata ha inhibido efectivamente el crecimiento de *K. pneumoniae* and *C. krusei*. En contraste con la actividad antibacterial de 0.5% de plata en la hidroxiapatita que tiene efecto contra *E. coli* y *B. subtilis* y el crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* fue inhibido con plata al 1% (Choi, Cho et al. 2004; Costescu, Ciobanu et al. 2013). Una cantidad excesiva de plata en la hidroxiapatita puede ser toxica, no solamente para los microorganismos sino también para el tejido de mamíferos y puede conducir a la inhibición de estos (Choi, Cho et al. 2004; Roy, Fielding et al. 2012; Thian, Lim et al. 2012).

Por lo tanto, es importante la selección de la concentración de plata apropiada en la hidroxiapatita, debe de ser suficiente para combatir eficazmente a los microorganismos mientras que se debería limitar el efecto negativo en células de mamíferos.

### **Bioactividad**

Un material bioactivo se define como un material que provoca una reacción específica de superficie cuando es implantado en el cuerpo, llevando a la formación de una capa tipo HA que es responsable de generar una unión firme con los tejidos duros. El comportamiento bioactivo de HA y otras cerámicas se puede demostrar preliminarmente por la mineralización *in vitro*. Este experimento permite evaluar la bioactividad de un material por su capacidad de generar una capa de HA en su superficie cuando es sumergido en fluido corporal simulado (SBF) (Kokubo and Takadama 2006). El mecanismo propuesto es que los materiales bioactivos muestran una carga superficial negativa en SBF, debido a deprotonación de grupos tipo  $-\text{COOH}$  u  $-\text{OH}$  a pH fisiológico. Esta carga

negativa atrae iones de calcio creando una capa rica en  $\text{Ca}^{2+}$  con potencial de superficie positivo, que atrae a iones negativos en soluciones tipo fosfato, llevando a la deposición de una capa pobre en  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig 4). Este proceso se repite generando la capa de HA en la superficie del material. Se ha sugerido que la bioactividad *in vitro* es un índice del potencial bioactivo de un material *in vivo* (Kim, Knowles et al. 2005; Landi, Tampieri et al. 2005).

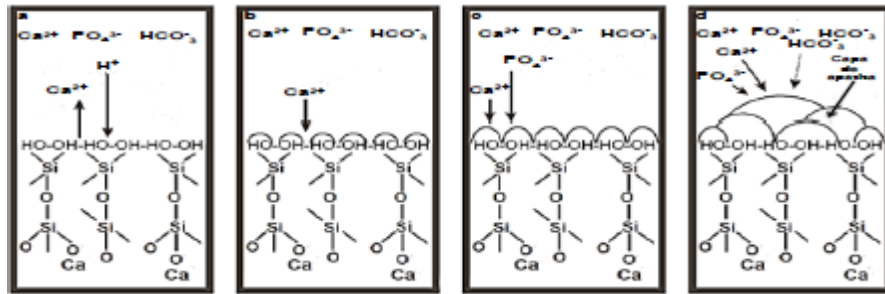


Figura 4.- Ejemplo de formación de apatita sobre una superficie de biovidrio

## IMMUNEPOTENT-CRP

Es un dializado de una mezcla heterogénea de sustancias de bajo peso molecular liberados por los leucocitos de sangre desintegrados o de tejido linfóide homogeneizado obtenido de bazo bovino. Este extracto dializable de leucocitos (EDL) contiene diferentes componentes y se ha demostrado que varios de ellos son capaces de modificar la respuesta del sistema inmune, sus moléculas son de un tamaño menor a los 3.500 Da (Franco-Molina, Mendoza-Gamboa et al. 2004; Franco-Molina, Mendoza-Gamboa et al. 2005; Franco-Molina, Mendoza-Gamboa et al. 2006). Existen distintos estudios donde se comprueban las diferentes actividades del ICRP tanto *in vitro* como *in vivo* (Rodríguez-Balderrama, Pérez-Martínez et al. 2000). En el 2005 se demostró que este compuesto puede disminuir la producción de  $\text{TNF-}\alpha$  y de IL-6 y a su vez aumentar la producción de IL-10, después de ser utilizado como tratamiento, en macrófagos peritoneales murinos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) (Franco-Molina, Mendoza-Gamboa et al. 2005). Este grupo de investigadores comprobó que el ICRP puede modular la expresión de mRNA de algunas citocinas pro-inflamatorias en células sanguíneas humanas estimuladas con LPS, así como la producción de estas mismas ( $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6 e IL-10) sin afectar la



viabilidad de las células sanguíneas (Franco-Molina, Mendoza-Gamboa et al. 2007). Recientemente se observaron otras propiedades anti-inflamatorias del ICRP en macrófagos humanos estimulados con LPS de las cuales podemos destacar que disminuye la producción de óxido nítrico (ON) y TNF- $\alpha$ , incrementa moléculas antioxidantes y disminuye la fosforilación de I $\kappa$ B y la unión de NF- $\kappa$ B al DNA. Las características del ICRP para modular moléculas oxidantes e inflamatorias es de mayor importancia ya que estos metabolitos son potentes mediadores pro-inflamatorios. El tratamiento con este compuesto disminuye las moléculas mencionadas anteriormente incrementando la actividad antioxidante intracelular de catalasas (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y súper óxido dismutasa (SOD) estas secuestran, reparan y previenen el daño causado por los radicales libres como el óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Franco-Molina, Mendoza-Gamboa et al. 2011). Se ha considerado que la sobre regulación de la IL-6 dada por el extracto, pueda promover la resolución de la inflamación iniciando el reclutamiento de los neutrófilos y favoreciendo la infiltración de los monocitos (Ojeda, van't Veer et al. 2005).

Se ha reportado que varios factores humorales que promueven la resorción de hueso actúan, al menos en parte, incrementando la expresión de RANKL, tal es el caso de la parathormona, la 1,25 dihidroxivitamina D o algunas citocinas, como la IL-6 (Riches, McRorie et al. 2009).

Otra citocina pro-inflamatoria como el TNF-  $\alpha$  causa destrucción del hueso por la inducción de la actividad de los osteoclastos, e inhibición de la osteoblastogénesis por diferentes mecanismos. Aquellos niveles altos de TNF-  $\alpha$  inhiben la formación de hueso in vitro, como in vivo. Sin embargo, las bajas dosis pueden aumentar la proliferación de osteoblastos. Esto sugiere un nivel homeostático de TNF- $\alpha$  para la regeneración óptima del hueso (Kotake and Nanke 2014) .

### **Ingeniería de tejidos**

Uno de los puntos clave en la regeneración de tejidos es desarrollar estructuras tridimensionales que sustituyan parte del órgano dañado o actúen como vehículo para transportar células y moléculas a lugares concretos del organismo. A pesar de las

excelentes propiedades de las cerámicas bioactivas, su uso aislado en forma de polvo no cumple con estos objetivos. Aplicaciones de ingeniería tisular han indagado en el desarrollo de nuevos biomateriales para estos fines. La **ingeniería tisular (IT)** se define como un campo interdisciplinario que aplica principios de ingeniería y ciencia para desarrollar sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función tisular. Esta disciplina se ha dedicado durante la década pasada a recrear órganos y tejidos funcionales con el objetivo de reemplazar tejidos enfermos o muertos (Kraigler y Mooney, 2001). La IT involucra conocimiento de áreas como biología celular, bioquímica, química, física, medicina e ingeniería, entre otros (Kraigler and Mooney 2001).

## **JUSTIFICACIÓN**

A pesar de que los injertos óseos han conseguido éxito y han sido uno de los mejores avances de la medicina, poseen ciertas limitaciones, considerando las desventajas y los costos altos que se le agregan al paciente. Es necesario contar con biomateriales de generación más avanzadas, que busquen restituir la función de los elementos de la cavidad oral que se han perdido, y que impliquen menor morbilidad asociada a la técnica, menor cantidad de procedimientos invasivos, menor riesgo de transmisión de enfermedades y mayor aceptación del paciente. Debido a esta situación es de gran interés el desarrollo y uso de nuevos materiales para reparación de tejidos óseos.

## **HIPÓTESIS**

Los sustitutos óseos a base de partículas de hidroxiapatita, nanopartículas de plata e IMMUNOPOTENT-CRP favorecen la regeneración ósea.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de regeneración ósea de nanocompositos cargados con hidroxiapatita, nanopartículas de plata e IMMUNEPOTENT-CRP

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de hidroxiapatita/plata.
- 2.- Evaluar la bioactividad *in vitro* de las nanopartículas de hidroxiapatita/plata en fluido corporal simulado.
- 3.- Determinar la liberación de  $Ca^{2+}$  de las nanopartículas de hidroxiapatita/plata.
- 4.- Evaluar la actividad citotóxica y genotóxica de las nanopartículas de hidroxiapatita/plata.
- 5.- Evaluar la actividad antimicrobiana de las partículas hidroxiapatita/plata.
- 6.- Determinar el efecto del nanocompuesto en la producción de proteínas específicas asociadas a la regeneración ósea (Osteocalcina, Runx2, TGF- $\beta$ ) en un cultivo *in vitro*.
- 7.- Determinar el efecto del nanocomposito en la producción de citocinas inflamatorias, su efecto antioxidante en un cultivo *in vitro*.
- 8.- Determinar el porcentaje de hinchamiento y degradación del nanocomposito.
- 9.- Evaluar la bioactividad de regeneración ósea del nanocomposito en un modelo *in vivo*.

## METODOLOGÍA

### Síntesis de partículas de hidroxiapatita con nanopartículas de plata (HA/Ag)

La síntesis de HA se realizó a través del método de co-precipitación reportado por Vukomanovic (Vukomanović, Bračko et al. 2011) con algunas modificaciones. Nitrato de calcio tetrahidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), fosfato de amonio di hidrogenado ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) y Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) fueron usados como precursores a través del siguiente procedimiento. Una solución 0.012 M de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  se agregó gota a gota a un volumen igual de una solución 0.02 M de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , bajo agitación constante de 15 000 rpm. Posteriormente se agregó por goteo urea 0.03 M y nitrato de plata 0.10 mg/ml en un volumen final de 100ml. Después de la mezcla se calentó a  $80^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Se ajustó y mantuvo el pH con una solución de hidróxido de amonio ( $\text{NH}_3$ ) en un pH 5.5. La solución resultante estuvo bajo agitación por 1 hora y se dejó reposar por 24 horas a temperatura ambiente. El precipitado fue separado y lavado a través de tres ciclos repetidos de centrifugado y redispersión en agua destilada, de 10 minutos cada uno a 4000 rpm. Luego, el precipitado se secó a  $70^\circ\text{C}$  en un horno por 24 horas, obteniéndose finalmente un polvo blanco y fino de HA/Ag.

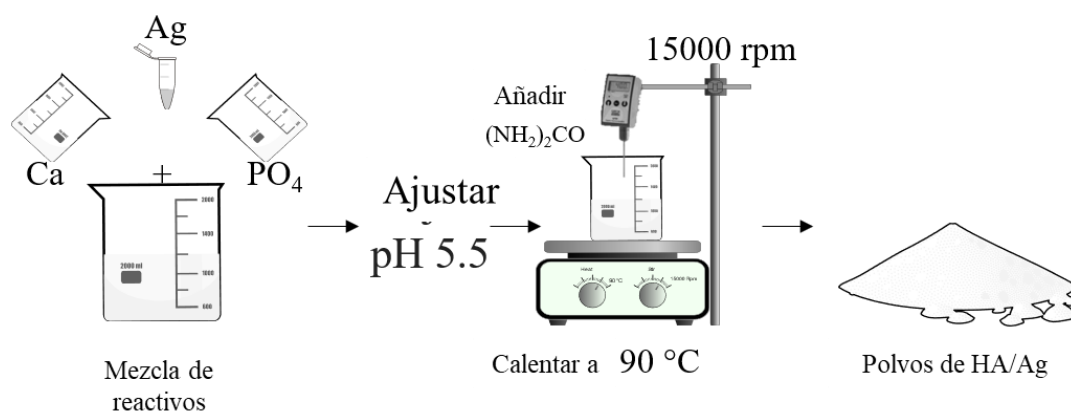


Figura 5. Esquema de reacción para la síntesis de partículas de HA/Ag

## **Caracterización de partículas de HA/Ag**

### Difracción Laser

El análisis de la distribución de tamaño de las partículas de HA/Ag se realizaron por difracción laser en un equipo HELOS (H3421) y RODOS. 5 mg de muestra fueron depositados en el portamuestra usando un método de dispersión con 3.00 bar de presión.

### Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR)

Esta técnica permite determinar los modos de vibración de los grupos químicos y su modificación por interacciones químicas y/o electrostáticas de los componentes del material sintetizado (HA/Ag). Las partículas obtenidas se analizaron por medio de un espectrofotómetro de infrarrojo marca Perkin Elmer modelo Spectrum One con aditamento de ART, analizados por la técnica de transmisión en un intervalo de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  y 24 barridos con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### Difracción de rayos X (DRX)

Las mediciones se realizaron empleando un difractor de Rayos X marca Rigaku model ULTIMA IV, equipado con fuente de cobre ( $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ ) operando a 30 kV y 20 mA, las muestras se fijaron en una lámina de cobre y los datos fueron colectados en un rango de 4 a 60° con un rango de movimiento angular de 0.02° y de esta manera se obtuvo el grado de cristalinidad del material, así como los ángulos de difracción proveniente de las nanopartículas en el material. El software usado para analizar el espectro fue MDI Jade 5.0 (versión libre).

### Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se usó para revelar la morfología, tamaño de las partículas sintetizadas y la composición elemental de las mismas por la técnica de espectroscopia de energía dispersa (EDS).

Las partículas de HA/Ag se dispersaron en isopropanol usando un baño ultrasónico, la muestra se colocó sobre una cinta de grafito hasta secar, se examinaron es un microscopio JOEL JXA 840A.

### Espectroscopia de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

El análisis de la concentración de plata fue realizado por mediciones de espectrometría de masas de acoplamiento inductivo. Las muestras de HA/Ag fueron carbonizadas a 300°C por 1 hora, el polvo obtenido se colocó en porta muestras de teflón. Posteriormente se sometieron a una digestión ácida a 250°C con ácido nítrico y ácido clorhídrico por 15 minutos.

### Espectroscopía Fotoeléctrica de rayos X (XPS)

El XPS es una técnica analítica de superficie, se basa en el uso de una fuente de rayos X, como radiación primaria para provocar la ionización de los átomos de una muestra. Se utilizó para establecer la composición primaria de las muestras en la superficie e identificar la presencia de Ag y su estado químico. Los espectros se obtuvieron en un equipo XPS (Thermo scientific).

### **Ensayo de actividad citotóxica de nanopartículas de HA/Ag**

Se cultivaron  $1 \times 10^5$  células óseas MG-63 en medio D-MEM (Gibco) enriquecido con 10% suero fetal bovino (Gibco) bajo una atmósfera a 37°C con 5% de CO<sup>2</sup> en placas de 96 pozos. Se tomaron en cuenta controles de crecimiento a los cuales no se agregó ningún tratamiento. Los pozos se trataron con diferentes concentraciones de HA/Ag (250-7ug/ml) y ICRP (1 – 0.031 U/ml cuando el cultivo celular llegó a un 80% de confluencia misma que se observó en el microscopio. La exposición de las partículas en las células se evaluó en un tiempo de incubación de 24, 48 y 72 horas Posteriormente, se añadió la solución bromuro (4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT Cell Viability Assay Kit Biotium) para obtener una concentración final de 0.5 mg/ml por pozo, se homogenizó agitando suavemente y se incubó a 37°C durante 4 horas. Después se añadió 200 µl de DMSO para disolver el formazan (MTT reducido) pipeteando varias veces. Posteriormente se utilizó el lector de placas de ELISA iMark® Microplate Absorbance



Reader (BioRad) a una longitud de onda de 570nm para su lectura. Cada experimento se desarrolló por triplicado para confirmar los resultados.

### **Evaluación genotóxica de partículas de HA/Ag por ensayo cometa.**

A partir de un cultivo de células óseas MG-63 confluentes en un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, se centrifugó un volumen que contenía  $1 \times 10^5$  células/ml y resuspendió en PBS 1x frío, previamente se precalentó la agarosa (Oxiselect<sup>TM</sup>) en baño maría a 90-95°C por 20 minutos y se mantuvo a 37°C para evitar su gelificación, se mezcló la muestra con la agarosa en una relación 1:10, e inmediatamente se agregó 75 µl a cada pozo del portaobjeto, se dejó gelificar a 4°C en la oscuridad por 15 minutos. Se transfirió el portaobjeto al buffer de lisis por 30 minutos a 4°C en la oscuridad, cuidadosamente se retiró el buffer de lisis y se reemplazó con solución alcalina por 30 minutos a 4°C en la oscuridad. La electroforesis se realizó en una solución alcalina durante 15-30 minutos a 35 volts. Transcurrido el tiempo se lavó con agua destilada por 2 minutos, y etanol frío al 7 % por 5 minutos posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente y se añadió 100 µl/ por pozo de “green dye” y se incubó por 15 minutos, se observó al microscopio con el filtro FITC.

### **Ensayo de bioactividad en fluido corporal simulado**

La habilidad de las partículas de HA/Ag para inducir la formación de apatita se evaluó en un fluido corporal simulado (SBF), el cual tiene concentraciones iónicas similares a las del fluido extracelular humano. Para la realización de este ensayo, basado en el método propuesto por Kokubo y Takadama, 2006 (Kokubo and Takadama 2006), se preparó en primer lugar la solución de SBF bajo la siguiente composición iónica estándar: Na<sup>+</sup>: 142.0 mM; K<sup>+</sup>: 5.0 mM; Ca<sup>2+</sup>: 2.5 mM; Mg<sup>2+</sup>: 1.5 mM; Cl<sup>-</sup>: 148.0 mM; HCO<sub>3</sub><sup>-2</sup>: 4.2 mM; HPO<sub>4</sub><sup>-</sup>: 1.0 mM; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>: 0.5 mM. En segundo lugar, se disolvieron las sales antes mencionadas en un vaso precipitado de 1000 mL, en el mismo orden en el cual se mencionan. La adición

de cada reactivo se realizó una vez disuelto completamente el reactivo previo. El fluido se neutralizó, ajustándolo a pH fisiológico de 7.4, a 37 °C con Tris/HCL. Una vez agregada la última sal y ajustado el pH, se aforó con agua destilada hasta completar 1000 mL de volumen. 5mg/ml de partículas HA/Ag fueron sumergidas en 50 mL de SBF 1X, en tubos cónicos de 50 ml de polietileno a 37°C, usando un baño termostático con agitación leve y constante por 1, 7, 14 y 21 días, el medio se cambió cada 2 días para mantener la concentración iónica. las partículas fueron removidas del SBF al finalizar cada periodo de incubación, se lavaron con agua destilada y secaron a 60°C por 24 horas. La fase de formación de apatita en la superficie de las partículas HA/Ag fue analizada con DRX y microscopia SEM equipada con EDX.

### **Ensayo de liberación de calcio de los polvos de HA/Ag**

El método empleado para determinar este parámetro fue el del complejo de O-cresolftaleina. El calcio forma un complejo de color púrpura con O-cresolftaleina en un medio alcalino. La inclusión del HCl ayuda al calcio liberado unido a proteínas y al 8-hidroxi-quinolina a eliminar la interferencia por magnesio, 2-amino, 2-methyl y 1-propanol (AMP) proporcionan el medio alcalino adecuado para el color de la reacción.

Se preparó una solución de Hank's sin  $Ca^{2+}$  y se conservó en refrigeración hasta su uso.

Posteriormente se preparó el buffer AMP (2-amino 2-metil 1-propanol 1.57 M pH10.7) a y el reactivo de coloración (HCL 3.479 mM, O-cresolphtaleina 0.015nM, 8-hidroxiquinolina 6.88nM) y se conservaron hasta su uso. Los intervalos de tiempo en los que se midió el rango de liberación de calcio fueron 1, 7, 14 y 21 días. Para ello primero se añadió la misma cantidad de partículas (3mg) en cada tubo cónico de 1.5 ml y se prepararon 3 repeticiones para cada muestra a analizar.

Luego se añadió 1 ml de solución de Hank's sin  $Ca^{2+}$  en cada tubo y se incubó por los tiempos establecidos a 37°C. También se utilizaron tubos únicamente con solución de Hank's sin  $Ca^{2+}$  como blanco en todos los resultados para evitar medidas erróneas.

Transcurrido cada tiempo se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 10 minutos, se extrajo el volumen de la solución de Hank's con el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado en 1, 7, 14 y 21 días, se traspasaron a nuevos tubos y se conservaron en refrigeración.

Para medir el rango de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizaron placas de 96 pozos estériles en las que se añadió en cada uno de los pozos 97,5µl de coloración, luego 5µl de las soluciones de Hank's con el calcio liberado y finalmente 97,5µl del buffer AMB. Se protegieron de la luz con papel de aluminio y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. De cada tubo con solución de Hank's y el calcio liberado se hicieron tres medidas. Con lo que finalmente se obtuvieron 9 valores para cada variable de tiempo. Finalmente se midió la absorbancia con el espectrofotómetro a 570 nm. Las respectivas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se determinaron mediante una función lineal dada por una curva de calibración.

Se repitió este experimento utilizando medio DMEM el cual fue conservado para evaluar el efecto de los iones de calcio liberados en la producción de proteínas asociadas en la regeneración ósea (Runx2) por 8, 24 y 72 horas en células MG-63

### **Actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana de las partículas de HA/Ag se analizó sobre 2 cepas bacterianas: *Escherichia coli* DH5α (ATCC, 53868) y *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC, BAA-1747) y una cepa de *Candida albicans* (ATCC, 900029) mediante el método de concentración mínima inhibitoria. Todos los microorganismos se cultivaron en un medio de tripticaseína de soya a 37 °C por 24 horas. El inóculo se obtuvo de una dilución del tubo 0.5 de la escala de McFarland con  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias. Después 100 µl de células microbianas con diferentes concentraciones de HA/Ag (250/7 µg/ml) se incubaron en placas de 96 pozos a 37°C por 24 horas. Para su análisis cuantitativo la placa se leyó a una longitud de 600nm utilizando una lectora de placas de ELISA.

## Estimación de los niveles de endotoxina

Para excluir la posibilidad de los efectos proinflamatorios es debido a una contaminación bacteriana en los polvos de HA/Ag, las partículas de HA/Ag fueron esterilizadas por autoclave e irradiación ultra-violeta (CL-1000 ultraviolet crosslinker) y los niveles de endotoxina se midieron usando un lisado de amebocitus de limulus. La concentración de endotoxina fue detectada por el kit PYROGENT™ usando las instrucciones del proveedor.

## Actividad antioxidante

Para determinar la producción de óxido nítrico (NO), células MG-63 se cultivaron con una densidad de  $2.5 \times 10^4$  células por pozo en una placa de 24 pozos, cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia fueron estimuladas con LPS (1 µg/ml), diferentes concentraciones de HA/Ag (250-7 µg/ml) ICRP (1-0.031 U/ml) y LPS en combinación con HA/Ag e ICRP se incubó a 37°C en una atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 y 48 horas. los sobrenadantes fueron colectados y usados para la detección de óxido nítrico. La concentración de Nitrito (NO<sub>2</sub>) producida por las células MG-63 fue usado para medir la producción de NO. La concentración de NO<sub>2</sub> fue determinado por espectrofotometría a 540 nm usando el kit colorimétrico de detección de NO (Cayman chemical) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, 80µl del sobrenadante se incubó con 10 µl de enzima cofactor y nitrato reductasa por 2 horas, después se añadió 50 µl de reactivo de Griess (1% sulfamida, 0.1% de diclorhidrato de N-1-naftiletildiamina, 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a temperatura ambiente por 10 minutos, y la absorbancia se leyó a 540 nm usando nitrato de sodio como estándar. La concentración de NO<sub>2</sub> se calculó siguiendo la siguiente ecuación.

$$[\text{Nitrate} + \text{Nitrite}](\mu\text{l}) = \left( \frac{A_{540} - y \text{ intercept}}{\text{slope}} \right) \left( \frac{200\mu\text{l}}{\text{volume of sample used}(\mu\text{l})} \right)$$

## **Efecto en la producción de citocinas pro-inflamatorias con actividad**

Para la detección de citocinas en sobrenadantes de cultivos *in vitro* se usó el kit Cytometric Array (CBA) Human inflammatory Cytokine Kit, para la medición de las citocinas IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70 y TNF- $\alpha$ , la captura se realiza por medio de microesferas conjugadas con anticuerpo específico, al detectar la citocina más el reactivo de detección se genera un tipo sándwich (microesfera + citocina + reactivo de detección). Se realizaron las siguientes combinaciones para evaluar el efecto inmunomodulador: Células S/ tratamiento, LPS 1 $\mu$ g/ml, LPS + Polimixina, como controles, y LPS + HA/Ag, LPS + ICRP y LPS + HA/Ag + ICRP.

Se resuspendió el reactivo estándar para human inflammatory con 2 ml del diluyente en un tubo cónico de 15 ml y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se rotularon tubos de 1.5 ml con las siguientes diluciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:128 y 1:256 se les añadió 300  $\mu$ l del diluyente a cada uno de los tubos, se agregaron 300  $\mu$ l del tubo estándar al tubo 1:2 y 300  $\mu$ l del 1:2 al 1:4 y así de manera sucesiva hasta el tubo 1:256. Al terminar se agrega un tubo cónico de 1.5ml con solo diluyente el cual será tomado en cuenta como negativo.

Se determinó el número de ensayos y se rotuló cada uno de los tubos incluyendo las muestras, los tubos de la curva estándar y el negativo. Se toman 10  $\mu$ l de cada perla capturadora de citocina por cada tubo de ensayo a analizar, se mezcla y se etiqueta como “mix de perlas capturadoras”.

Finalmente se añadieron 50  $\mu$ l del mix de perlas capturadoras a cada tubo, también se añadió 50 $\mu$ l de cada punto de la curva estándar en el tubo correspondiente, 50 $\mu$ l de cada muestra de los sobrenadantes en el tubo correspondiente y 50 $\mu$ l del reactivo de detección PE en todos los tubos. Se incubaron todos los tubos durante 3 horas a temperatura ambiente y sin exposición a la luz, transcurrido el tiempo, se agregó 1 ml de la solución de lavado y se centrifugó a 200g por 5 minutos se retiró el sobrenadante y se añadió nuevamente 300  $\mu$ l de solución de lavado a cada tubo y para su lectura se utilizó un citómetro de flujo Accuri C6 de Becton Dickinson, en donde se creó una platilla para el

análisis de las muestras usando 5000 eventos, y analizado en el programa FCAP array software.

### **Identificación de proteínas específicas en la regeneración ósea**

Se cultivaron  $2.5 \times 10^5$  células óseas en medio D-MEM (Gibco) enriquecido con 10% suero fetal bovino (Gibco) bajo una atmósfera a 37°C con 5% de CO<sup>2</sup> en placas de 6 pozos por 7, 14 y 21 días y se tomaron en cuenta los siguientes controles: Células sin tratamiento, con medio osteogénico, ICRP, HA, HA/Ag y HA/Ag-ICRP. Transcurrido los diferentes tiempos se lavó con PBS 1X una vez, se tripsinizó y después de homogenizar se transfirió a un tubo Ependorff y se fijó con formol al 4% por 10 minutos a 37°C después se incubó 1 minuto de hielo, se centrifugó a 2,000 rpm por 2 minutos se decantó y resuspendió en 1 ml de metanol al 90% por 30 minutos en hielo para permeabilizar. Para realizar la tinción se centrifugó y decantó y se lavó 2 veces con buffer de lavado (PBS 1x-SFB 1%) posteriormente se resuspendió en 100ul de PBS con anti-osteocalcina y anti-TGF-β 1:50 por 1 hora a 37 °C en un ambiente húmedo, posteriormente se centrifugó y lavó con buffer de lavado 1 vez y se resuspendió en 100 ul de PBS 1x con el anticuerpo secundario anti-mouse/FITC y anti-coat/PE se incubó 1 hora a 37 °C en un ambiente de humedad y finalmente transcurrido el tiempo se lavó con buffer de lavado 1 vez y se resuspendió en 100 μl de PBS 1X para su lectura en el citómetro.

### **Ensayo de hinchamiento *in vitro***

El hinchamiento de los nanocompuestos fue estudiado utilizando solución de Hank's y se evaluó el incremento del peso respecto al tiempo. Los compositos fueron depositados en una placa de 6 pozos hasta secar, se registró su peso inicial (Mi). Se realizaron mediciones los minutos 0.5, 1, 3, 5, 7, 15, 30, 60 de incubación. Al realizar cada control, se retiró el medio, posteriormente se pesó. Finalmente, se obtuvo el peso seco (Ms) de cada membrana. El hinchamiento fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Degradación (\%)} = \frac{(M_i - M_s)}{M_s} \times 100$$

El ensayo se realizó por triplicado y se consideró el promedio de las 3 muestras para su posterior análisis.

### **Ensayo de degradación *in vitro***

La degradación de los nanocompuestos fue estudiada utilizando medio de cultivo celular (D-MEM), y se evaluó la pérdida de peso del nanocomposito en función del tiempo. Los nanocompuestos fueron depositados en placas de 6 pozos hasta secarse, posteriormente se añadió 5 mL de medio de cultivo cada uno. Previo a sumergirlas en el medio, se registró su peso inicial ( $M_i$ ). Se realizaron mediciones en los días 1, 6, 12, 18, 24, 30 de incubación. Al realizar cada control, se midió el pH del medio de cultivo, luego se retiró el medio, se dejó secar la membrana, y posteriormente se pesó. Finalmente, se obtuvo el peso seco ( $M_s$ ) de cada membrana. La degradación será calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Degradación (\%)} = \frac{(M_i - M_s)}{M_i} \times 100$$

El ensayo se realizó por triplicado y se consideró el promedio de las 3 muestras para su posterior análisis.

### **Ensayo de regeneración en un modelo *in vivo***

Se utilizaron 20 ratas blancas machos de cepa Wistar de 12 semanas de edad proporcionados por el bioterio del laboratorio de Inmunología y Virología, dicho protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas, (CEIBA) de la UANL No. registro CEIBA-2018-020. Los animales fueron distribuidos en 5 grupos, según el tipo de biomaterial de relleno utilizado.

Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de ketamina (95 mg/kg) y xylacina 10 mg/kg), y posteriormente se infiltró localmente con mepivacaina (Ultracáin<sup>®</sup>, 0,5ml sin vasoconstrictor). Una vez anestesiados los animales se colocaron

los animales en posición decúbito dorsal, se inmovilizó la boca para que quedase abierta. Se colocaron gasas estériles en la zona genital por la posible micción.

En la zona del premaxilar, en el fondo del vestíbulo se realizó una herida de 3mm con un bisturí #15, posteriormente se realizó una cavidad de 1.5mm de diámetro con una fresa de carburo #6 utilizando un micromotor de baja velocidad, se irrigó con solución salina con una jeringa para evitar necrosis por la elevación de la temperatura.

Tras la perforación se presionó la herida con una gasa estéril durante 2 minutos para detener el sangrado y facilitar la colocación del material. El experimento se realizó de forma unilateral. El biomaterial se colocó de acuerdo con los siguientes grupos. En el grupo 1: el defecto se dejó vacío y sin cubrir, el grupo 2: Se utilizó el nanocomposito HA/Ag con la mezcla de quitosano, HA/Ag e IMMUNOPOTENT-CRP. Grupo 3: nanocomposito HA/Ag con quitosano. Grupo 4 quitosano con ICRP, los grupos 2-4 se colocó una membrana de quitosano 2% para evitar la extracción del material.

Se realizó un seguimiento clínico posquirúrgico, valorándose una serie de parámetros: estado general del animal, aspectos de la herida y de la zona intervenida, sangrados, exudado, extrusión de los biomateriales o membranas, y cambios degenerativos por lesión dentaria (Kim, Moon et al. 2013; Erdemci, Gunaydin et al. 2014).

Una vez terminado el periodo experimental de 4 semanas, se procedió al sacrificio de los animales mediante decapitación. Valoración macroscópica. En el momento del sacrificio y disección de las muestras, se realizó una valoración descriptiva de los siguientes parámetros: a) organización anatómica y tisular, b) infecciones, exudados o lesiones hísticas; c) desplazamiento del lecho de los biomateriales; d) presencia de fracturas; e) cambios degenerativos dentarios; f) secuestros óseos; g) consistencia y forma superficial del defecto.

La obtención de las muestras se realizó mediante extirpación en bloque de los maxilares. Posteriormente se realizó una valoración macroscópica y seguida de inmersión en formol al 10% tamponado, para posterior procesamiento histológico.

Los bloques óseos se sumergieron en una solución descalcificante de ácido fórmico por 124 horas, y neutralizados por 24 horas y fueron procesados, incluidos en parafina, talladas mediante un micrótopo de rotación, y finalmente teñidos mediante hematoxilina-eosina.



Valoración histológica. Para la lectura histológica de las preparaciones se utilizó un microscopio óptico Olympus BX41 adaptado a una cámara digital, y conectado a un ordenador para la recopilación de imágenes.

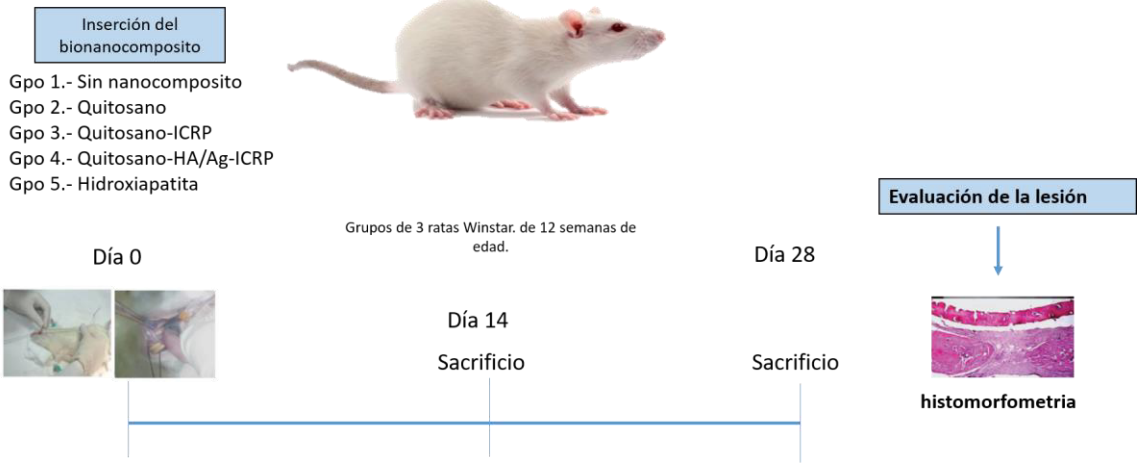


Figura 6. Esquema del modelo de regeneración *in vivo*

## RESULTADOS

### Síntesis y caracterización

Se estableció un método de síntesis de partículas de HA/Ag las cuales tienen una morfología irregular y la mayoría de las partículas muestran un tamaño de  $1.37 \mu\text{m}$ , aunque también se encontraron partículas de HA/Ag de hasta  $370 \text{ nm}$  (Fig. 7a). Sobre su superficie se observaron adheridas nanopartículas de plata de forma esférica con un tamaño de  $23 \text{ nm}$  (Fig. 7b).

En el análisis por EDS se identificaron picos de máxima intensidad que corresponden a la presencia de elementos como Ca, P, O, C y Ag. Esto puede ser un indicativo de que la Ag ha sido incorporada a los polvos de HA (Fig. 7c) Además se examinó más a fondo la composición realizando un mapeo sobre la muestra identificando la distribución de cada uno de los elementos por colores (Fig. 8).

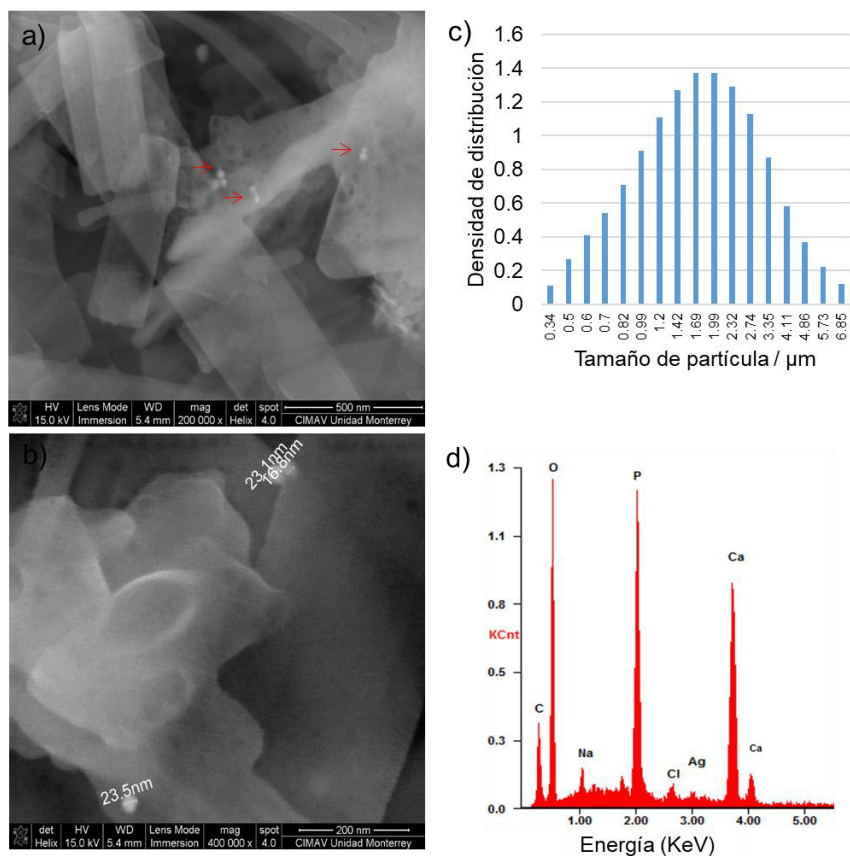


Figura 7. Caracterización de polvos de HA/Ag (a,b) microscopia electrónica de barrido (SEM) (c) Difracción laser (d) espectroscopia de energía dispersa. Las flechas rojas señalan las nanopartículas de plata.

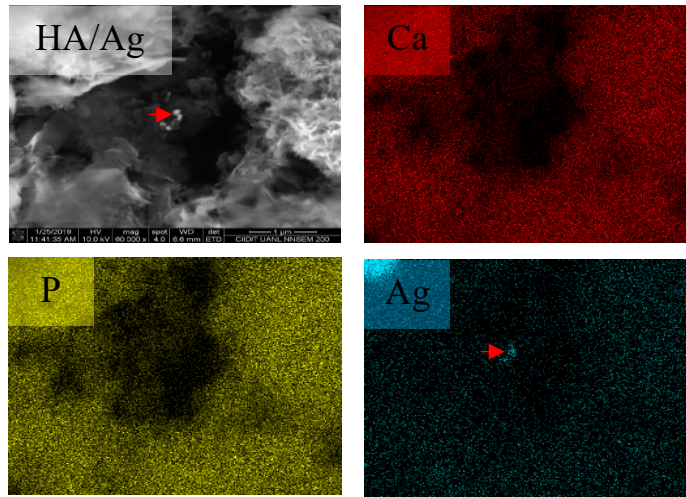


Figura 8. Mapeo de polvos de Ha/Ag por EDS.

El espectro de FT-IR de HA y HA/Ag se observa en (Fig. 9). las principales bandas características de la HA pura pueden observarse a  $3456$  y  $3569\text{ cm}^{-1}$  relacionadas con los modos de vibración de los grupos  $\text{OH}^-$ , las vibraciones de los grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  pueden observarse a  $471, 561, 600, 962, 1027$  y  $1088\text{ cm}^{-1}$  y las bandas para los grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  aparecen a  $876, 1342, 1461, 1629$  and  $1666\text{ cm}^{-1}$ . Cuando la Ag fue añadida, la banda que corresponde a los modos de vibración de  $\text{OH}^-$   $3456$  disminuye. Además, la resolución de la banda que corresponde a la vibración de  $\text{CO}_3^{2-}$  también se encuentra disminuida en el compuesto con plata, esta disminución puede ser asociada con un aumento en el intercambio de iones dentro de la estructura de la apatita.

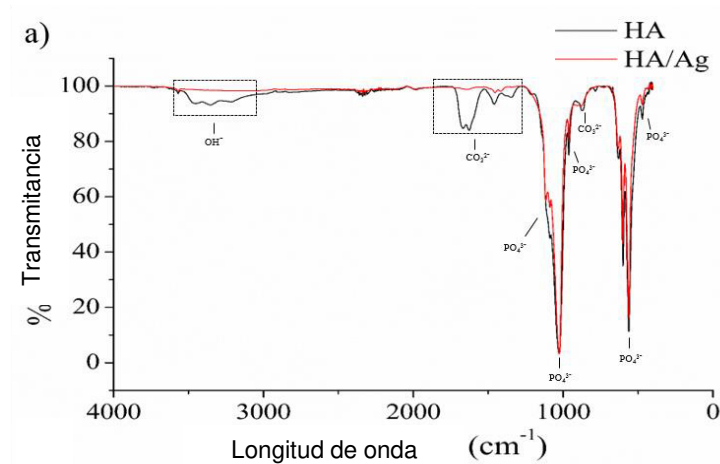


Figura 9. Espectro de FT-IR de polvos de hidroxiapatita/plata.

La XRD es una técnica para determinar la fase de cristalinidad de cualquier muestra y es indicativo de la estructura química. La fase de identificación de las partículas de HA/Ag revela los típicos picos de difracción en el ángulo 38.16 y 46.7 que corresponden a la estructura de la Ag cubica (JCPDS No. 4-0783) junto con los principales ángulos de difracción de la HA 25.8°, 31.7°, 32.1°, 32.9°, 34.04°, 46.7°, y 49.5° ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ), el pico de mayor intensidad se observa a 31.7 del ángulo teta( $\theta$ ), que corresponde al principal pico de la estructura hexagonal de la hidroxiapatita (JCPDS No. 9-0432) (Fig. 10).

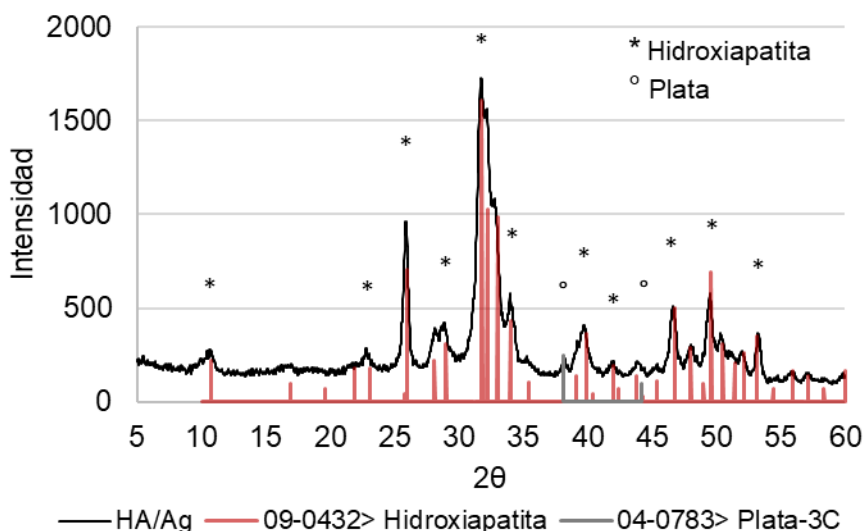


Figura 10. Patrón de difracción de rayos X de los polvos de HA/Ag.

La incorporación de Ag en la Ha fue corroborada usando las mediciones de XPS. En la figura 11 se muestran los espectros de HA y HA/Ag. La energía de enlace (BE) de los espectros encontrados en ambas muestras se resumen en la tabla 1. También es posible ver una contribución en torno a 373.03 y 368.69 eV, que podrían corresponder a  $\text{Ag}3d_{5/2}$  y  $\text{Ag}3d_{3/2}$ .

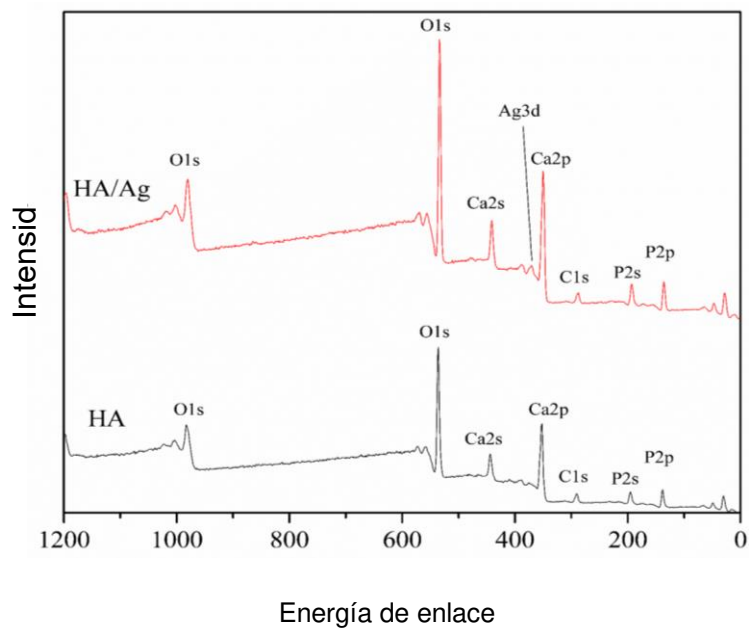


Figura 11. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) para los polvos de HA/Ag.

Tabla 1.- Energía de enlace (BE) de los elementos presentes en el espectro de XPS

Elemento/Configuración electrónica		BE(eV) HA	BE (eV) HA/Ag	% atómico
Ca2p		352.36	350.5	23.69
P2p		138.05	135.91	---
O1s		536.26	534.15	64.16
C1s		290.74	288.92	11.78
Ag3d	Ag3d <sub>5/2</sub>	---	373.02	0.36
	Ag3d <sub>3/2</sub>	---	368.69	---

En la tabla 2 se muestra la composición química de las partículas de HA/Ag, expresado en porcentaje en peso, de los elementos de Ca y Ag presentes en la materia. Dichos datos son el resultado del análisis de ICP-OES el cual identificó la cantidad de Ag que fue de 16,640.0mg/kg que corresponde a 0.01%.

Tabla 2. Análisis elemental de HA/Ag por ICP-OES

Muestra	Ag (wt%)	Ca (wt%)
HA/Ag	1.66	31

### **Bioactividad**

Nuestras partículas de HA/Ag fue capaz de inducir la nucleación y precipitación de Ca y P con la típica morfología de HA. Las imágenes de SEM después de 1 y 7 días de incubación en SBF muestra la formación de aglomerados amorfos con una relación de Ca/P de 1.43 y 1.28, respectivamente (Fig. 12. a-b).

Después de 14 días de incubación, se observa en las imágenes varios precipitados con forma de hojuelas en la superficie de la HA/Ag con una relación de Ca/P de 1.58. Estas características pueden ser asociadas con la formación de capa de apatita en la superficie de HA/Ag (Fig. 12 c).

Los patrones de XRD de HA/Ag de la incubación de 1-14 días varios picos de difracción pueden ser atribuidos a la presencia de dos fases de fosfatos de calcio. Fosfato tricalcico (TCP) y Fosfato octacalcico (OCP) sin embargo los picos no están bien definidos (Fig 12 a-c). En el patrón después de la incubación de 21 días, se observan los principales picos de difracción de la HA (Fig. 12 d). La plata elemental no se cuantificó en el análisis de EDS y sus ángulos de difracción no se detectaron; esto podría indicar la bioactividad de las nanopartículas de plata Tabla 3. Otros elementos como: Na, Mg, K, Cl fueron identificados en la muestra, que también se encontraron en estructuras de apatita ósea y pueden estar asociadas con el intercambio iónico en el momento de incubación en el SBF.

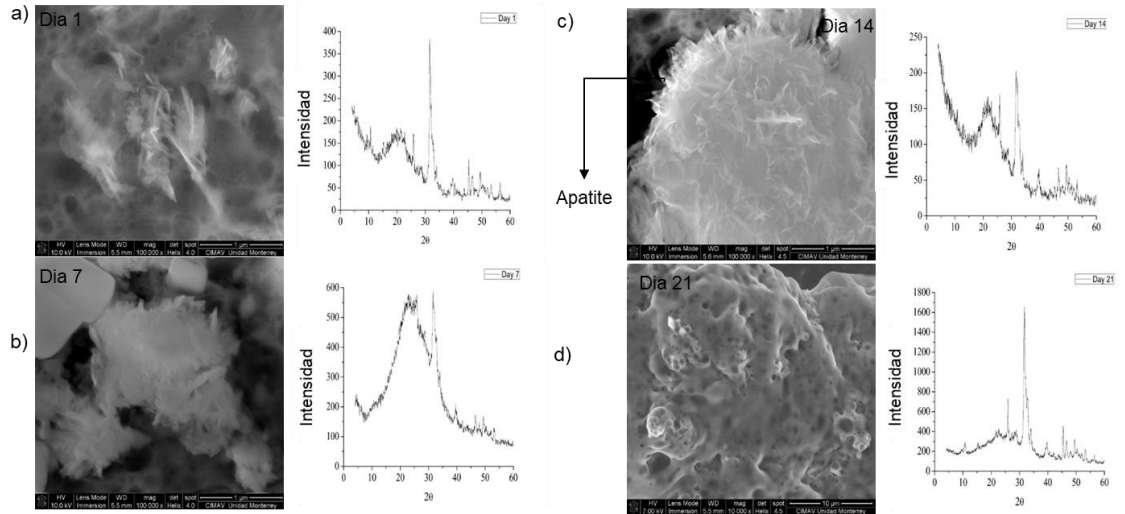


Figura 12. Microscopia electrónica de barrido y difracción de rayos X de las partículas HA/Ag después del proceso de bioactividad en SBF. a) 1 día b) 7 días c) 14 días d) 21 días.

Tabla 3. Porcentaje atómico y relación Ca/P en la superficie de la muestra de HA/Ag por EDS.

Día	Elementos			Ca/P
	Ag	Ca	P	
1	-	14.3 %	9.97 %	1.43
7	-	8.86 %	6.92 %	1.28
14	-	16.2 %	10.2 %	1.58
21	-	17.3 %	10.3 %	1.63

### Liberación de $\text{Ca}^{2+}$

Los resultados de liberación de calcio muestran un incremento en la cantidad de calcio liberado respecto al tiempo. En todos los tiempos analizados los polvos de HA liberaron una mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  que los de HA/Ag. Nuestro compuesto de HA/Ag liberó a los 21 días una concentración 0.4216 mM/mg, mientras que la hidroxiapatita pura liberó 0.4919 mM/mg en el mismo periodo de tiempo. Aunque esta diferencia no fue significativa. Durante la síntesis es posible la sustitución de los cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$  con otros iones positivos como  $\text{Ag}^+$ , lo que puede explicar este resultado (Fig. 13 a). El medio de cultivo DMEM que contenía los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  que se liberaron por las muestras de HA y HA/Ag por 21 días, se utilizó para cultivar células MG-63 por 8, 24 y 72 horas. Los

resultados muestran que el medio de las partículas de HA/Ag estimula la producción de Runx2 hasta un 11.3% más que el control sin iones de calcio, incluso 5.9 % más que el medio de cultivo que contenía los iones liberados por la HA pura.

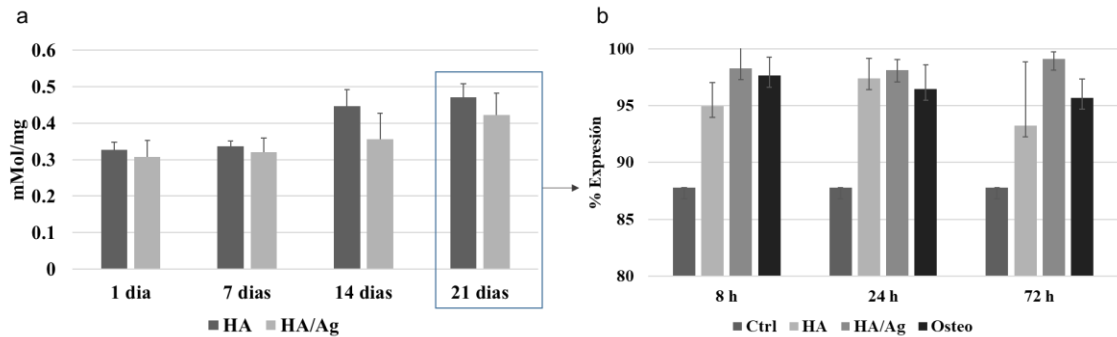


Figura 13. Liberación de calcio de partículas de HA con y sin Ag (a) y su efecto en la producción de Runx2 (b).

### Efecto citotóxico y genotóxico

El efecto citotóxico de las partículas de HA/Ag fue evaluada en la línea celular MG-63 y MC3T3-E1 (Fig. 14). Después de 24 horas de incubación de tratamiento con las partículas de HA/Ag, los resultados muestran un porcentaje de viabilidad mayor al 81 % incluso a la mayor concentración (250  $\mu\text{g/ml}$ ), esto sugiere la ausencia de efectos tóxicos en las células de osteosarcoma humano. Además, se realizaron experimentos con una exposición más prolongada. Los resultados muestran una viabilidad del 75% a 250  $\mu\text{g/ml}$  después de 72 horas. Mientras que las concentraciones por debajo del 31 $\mu\text{g/ml}$  después de 72 horas mostraron una viabilidad mayor al 89% (Fig. 14. a). En cambio, la concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$  en MC3T3-E1 mostró una viabilidad del 80% a 24 horas de tratamiento, y en los tiempos posteriores los resultados fueron muy similares (Fig. 14. b). Con base en estos resultados con MTT se seleccionó la concentración de 15  $\mu\text{g/ml}$  con la cual se mantuvo la viabilidad al 90% en los 3 periodos de tiempo. A las células tratadas por 72 horas a esta concentración se realizó pruebas de genotoxicidad donde se observó su integridad. En la Figura 14 b, d no se observa la aparición de la estela que simula el cometa, indicando que no hubo una fragmentación del DNA en ambas líneas celulares.



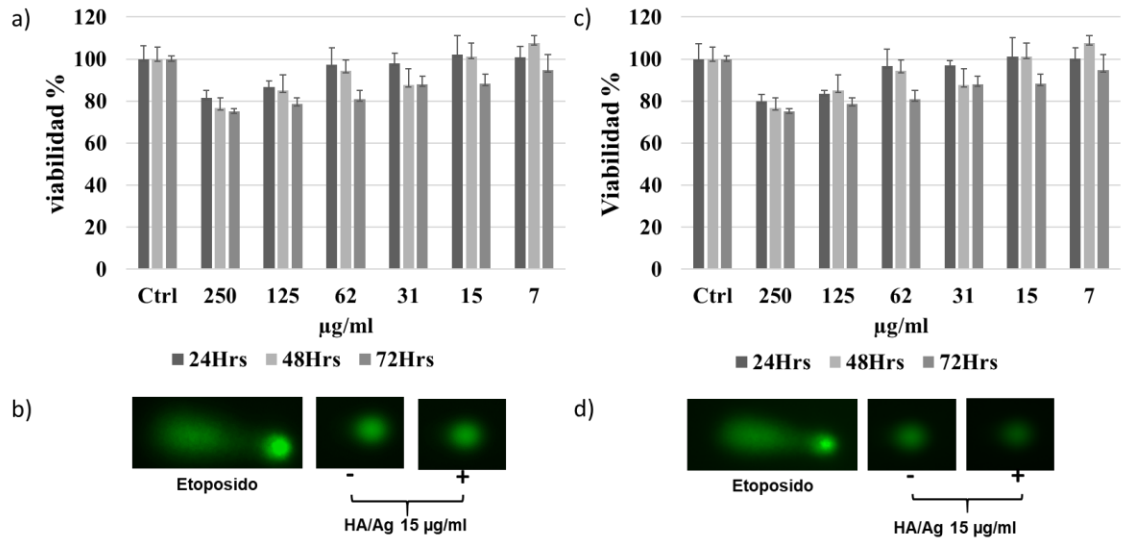


Figura 14. Ensayo de viabilidad y genotoxicidad en células MG-63 (a-b) y MC3T3-E1 (c-d).

Con respecto al efecto citotóxico de ICRP. Se probaron concentraciones a partir de 1 - 0.03 U/ml en un periodo de 24-72 horas. En la línea celular MG-63 la concentración de 1 U/ml mostro una viabilidad de 12 % a 24 horas y 3 % a 72 horas, la concentración de 0.12U no se afectó la viabilidad manteniendo un porcentaje entre el 92 y 100%. La línea celular MC3T3-E1 fue menos sensible a ICRP en los tiempos de incubación antes mencionados (Fig. 15).

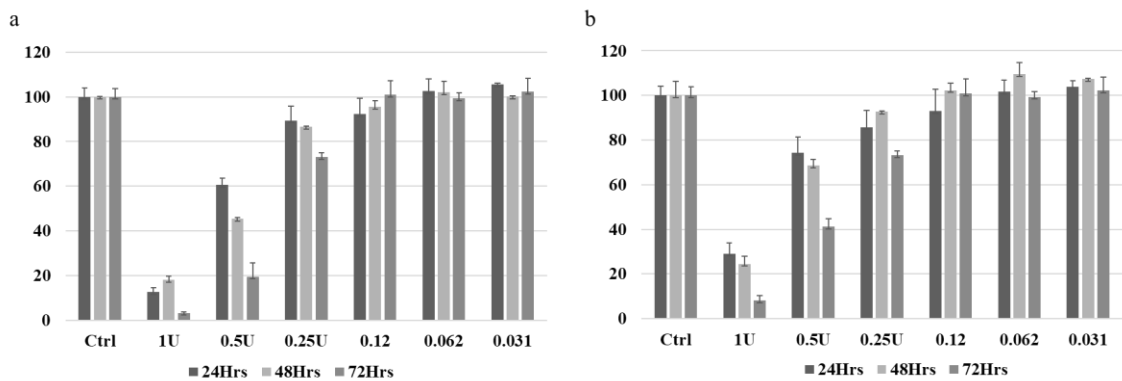


Figura 15. Ensayo de viabilidad de ICRP en células MG-63 (a) y MC3T3-E1 (b).

### **Mineralización de la matriz extracelular**

Como se observa en la figura 16, el área que contiene la matriz mineralizada se detectó por la aparición de nódulos rojos con la tinción rojo de alizarina, después de la incubación con los tratamientos de ICRP 0.1 U/ml, HA y HA/Ag 15 µg/ml y en combinación HA/Ag. 15 µg/ml-ICRP 0.1 U/ml comparado con un grupo sin tratamiento. La mineralización se analizó por diferentes periodos de tiempo de 7-21 días (Fig.16). En los nódulos rojos calcificados (indicativo de una diferenciación y calcificación) se observó que, los grupos con fosfatos de calcio tienen una mayor aparición de nódulos a partir de los 14 días. Y se encontraron diferencias significativas a partir del día 21 contra los grupos sin fosfato de calcio, pero no hubo diferencias significativas entre la HA, HA/Ag y HA/Ag-ICRP. Esto sugiere que los fosfatos de calcio promueven la mineralización *in vitro* (Fig. 16).

### **Detección de proteínas asociadas a la regeneración ósea**

La figura 17 muestra el porcentaje de expresión del factor de transcripción Runx2 en un periodo de 8-72 horas y la figura 18 las proteínas osteocalcina y TGF-β detectadas en un periodo de 7, 14 y 21 días producidas por células MG-63, todos los tratamientos probados aumentaron su expresión en comparación con el grupo control. Se observa que el grupo tratado con HA/Ag aumentó de un 26 % a un 41 % de 8-72 horas, superior a la HA pura que aumentó un 19.9% a las 72 horas (Fig. 17). Mientras que el ICRP tuvo su mayor porcentaje de expresión a las 24 horas con 43 %. Cuando ambos tratamientos se combinan aumenta la producción del factor de transcripción Runx2 un 35 % hasta un 57.4 % en el periodo de 8 a 72 horas.

Respecto a la producción de osteocalcina los compuestos de HA/Ag aumentaron su producción a un 36 % al día 14 en comparación con 30% de la HA pura. La mayor diferencia se observó en la combinación de HA/Ag-ICRP aumentando la expresión de osteocalcina en un 59.4 y 57.9 a los 14 y 21 días.

Se detectó la mayor concentración del Factor de Crecimiento Transformante (TGF-β) a los 14 días con los compuestos cerámicos e ICRP, este mostró individualmente una expresión del 53.7 % y junto con la HA/Ag aumento a 65.9 % (Fig. 18).

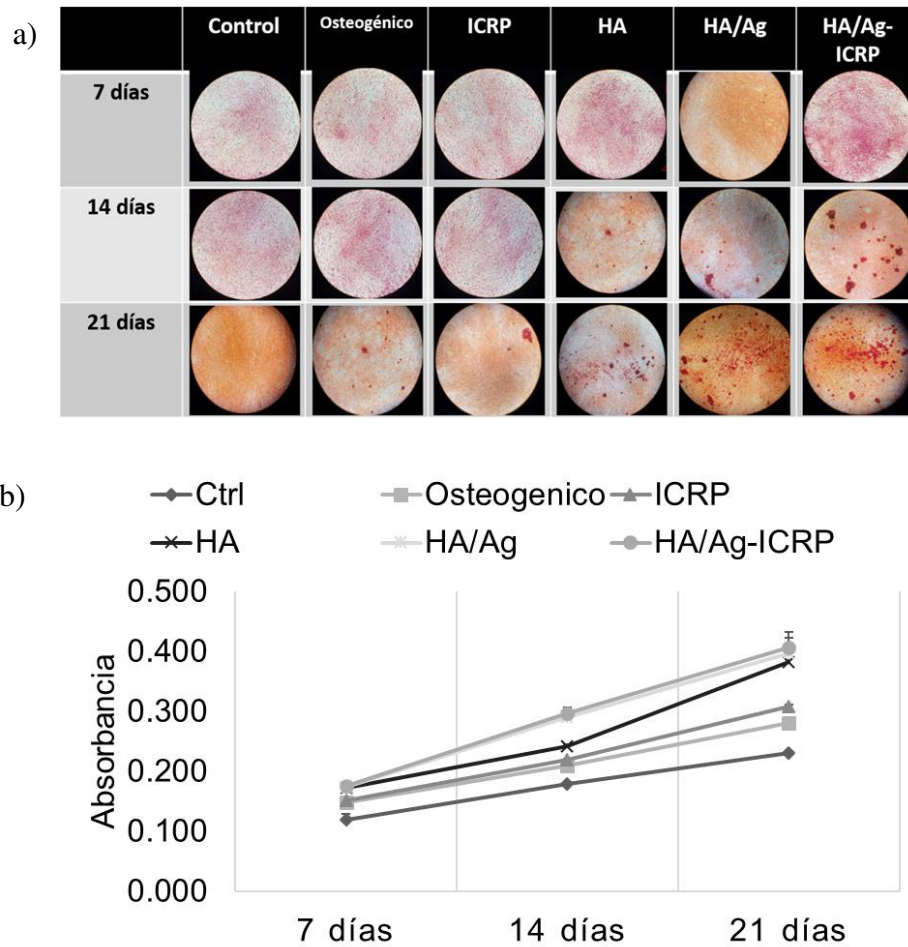


Figura 16. Efecto HA/Ag y HA/Ag-ICRP en la mineralización de la matriz extracelular de células MG-63. (a) las células MG-63 fueron tratadas con fosfatos de calcio e ICRP hasta por 21 días para visualizar la deposición de calcio. (b) Medición por absorbancia de la matriz extracelular mineralizada.

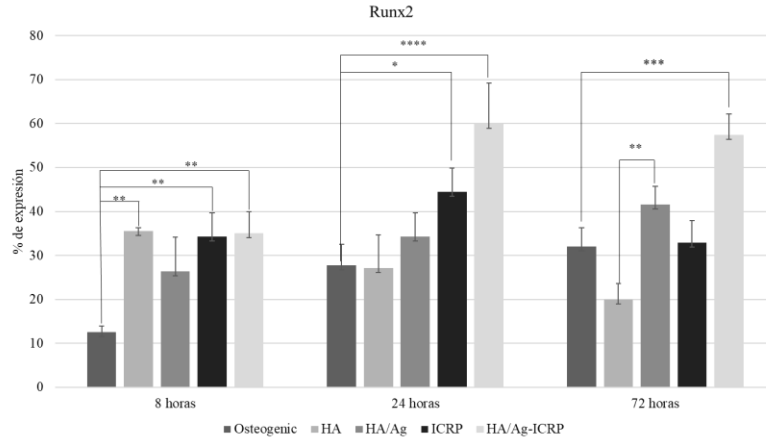


Figura. 17. Efecto de los nanocompuestos en la expresión del factor de transcripción Runx2.

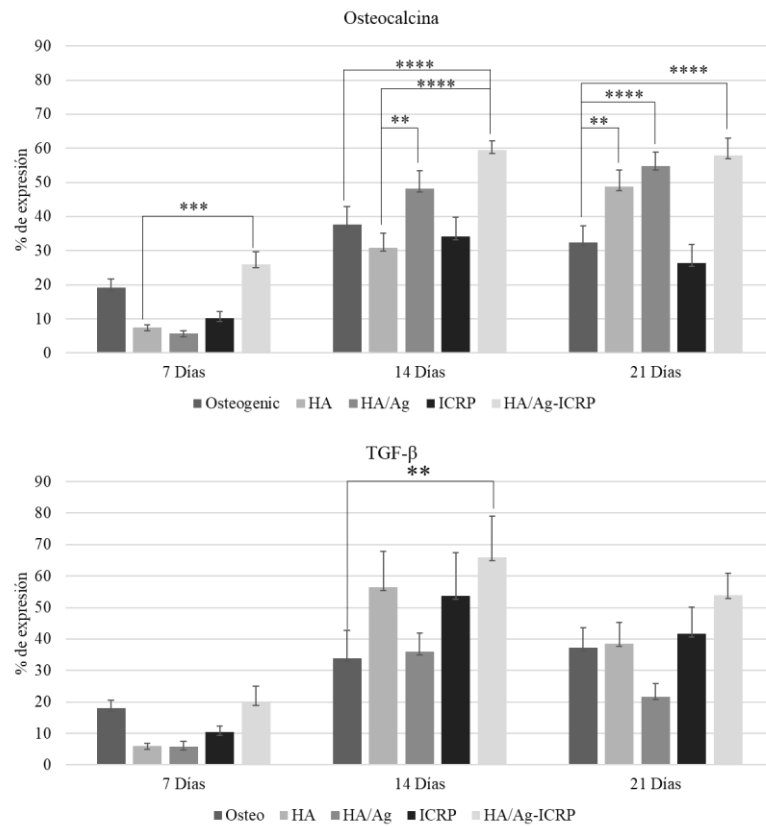


Figura 18. Efecto de los nanocompuestos en la expresión de osteocalcina (a) y TGF-β (b)

## Actividad antimicrobiana de HA/Ag

En la figura 19 se muestra una diferencia significativa del efecto antimicrobiano entre los polvos de HA y HA/Ag. Después de 24 horas de incubación, todas las concentraciones de las partículas de HA/Ag analizadas (7-250  $\mu\text{g/ml}$ ) tuvieron actividad antimicrobiana.

La concentración más baja de 7  $\mu\text{g/ml}$  disminuyó el crecimiento de *E. coli* en un 78 % hasta un 87% a 250  $\mu\text{g/ml}$ . Comparado contra MRSA que tuvo una inhibición del 84% a un 87% en las mismas concentraciones. Respecto a la actividad fungicida contra *C. albicans* el efecto inhibitorio fue de un 62 a 86%.

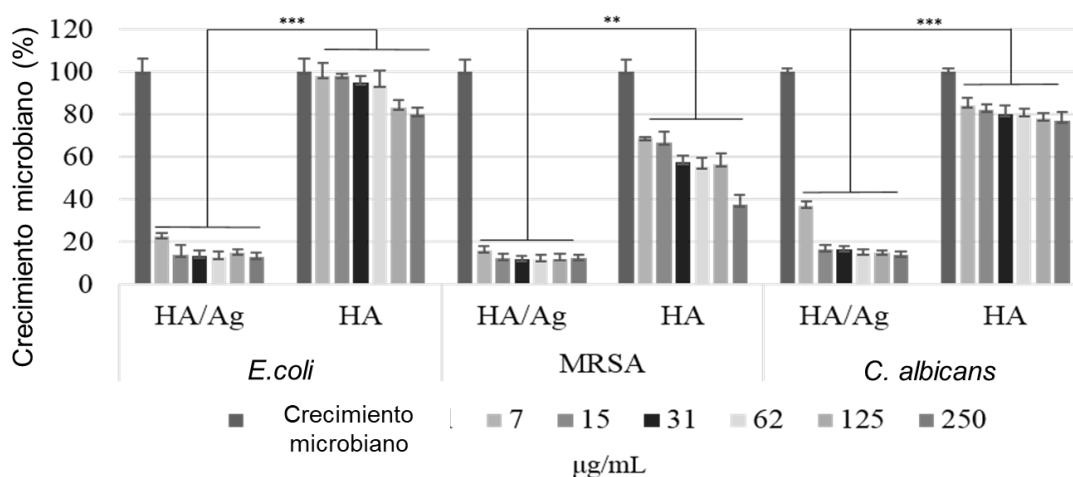


Figura 19. Actividad antimicrobiana de las partículas de HA/Ag contra *E. coli*, MRSA y *C. albicans*. \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

## Capacidad antiinflamatoria de los nanocompuestos

Para descartar efectos de inflamación ocasionados por muestras contaminadas, los nanocompuestos se evaluaron para determinar la presencia de endotoxina.

La detección de los niveles de endotoxina muestra que los polvos de HA/Ag no forman un gel en el tubo en todas las diluciones analizadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16), esto indica que los niveles de endotoxina están por debajo de 0.06 UE/mL (tabla 4).

Tabla 4. Detección de endotoxina: Los polvos de HA/Ag fueron analizados por PYROGENT™. La endotoxina de *E.coli* 0111B4 fue usada como control positivo

Endotoxin concentración / Positive control dilution	Control positivo	Control negativo	HA/Ag
0.5 UE/ml	(+)	(-)	(-)
0.25 UE/ml	(+)	(-)	(-)
0.125 UE/mL	(+)	(-)	(-)
0.06 UE/mL	(+)	(-)	(-)

La actividad antioxidante de los polvos de HA/Ag fue cuantificada por la producción de óxido nítrico (NO) en células MG-63 estimuladas con LPS (1µg/ml). La figura 20 muestra que la concentración de NO incrementó considerablemente con el tratamiento de LPS a 24 horas (0.157 µm/ml). Cuando se agregó el tratamiento de HA/Ag en combinación con LPS, todas las concentraciones mostraron una inhibición de la liberación de NO. Ocurre un evento similar a las 48 horas la incubación de las células MG-63 con LPS incrementó la producción de NO a 0.231 µm/ml, en combinación con HA/Ag la concentración de 7 µm/ml disminuyó a 0.082 µm/ml. Respecto a la actividad antioxidante del ICRP se probó la concentración de 0.1 U/ml junto con LPS, el efecto inhibitorio en la producción de NO se redujo a 0.037 y 0.051 µm/ml a las 24 y 48 horas respectivamente. Y el tratamiento de HA/Ag + ICRP + LPS 0.031 µm/ml a las 24 horas y 0.047 µm/ml a las 48 horas después. No hubo diferencia significativa entre tratamientos.

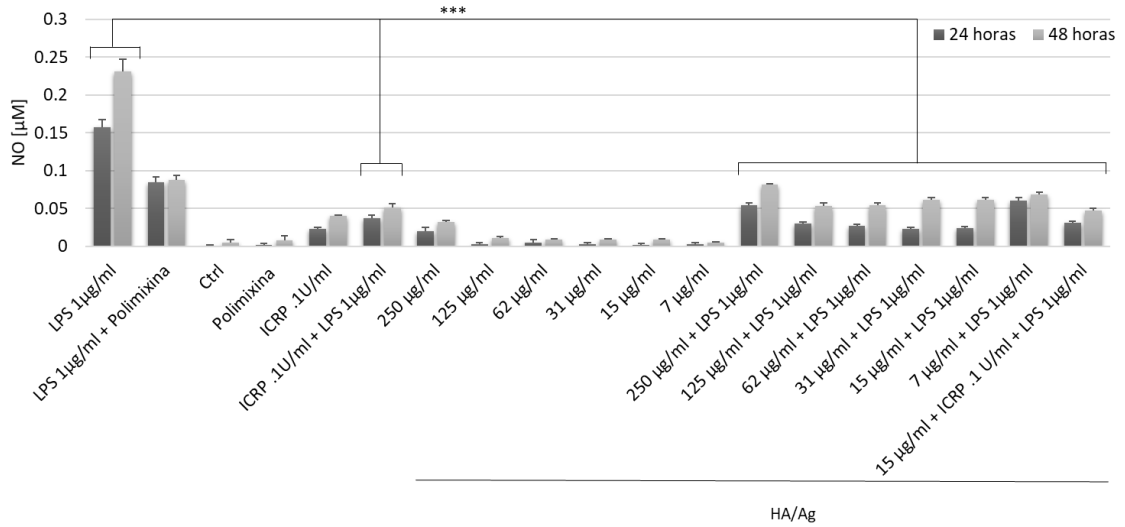


Figura 20. Efecto en la inhibición de óxido nítrico de las partículas de HA/Ag e ICRP en células MG-63.

Los resultados obtenidos de los análisis de citocinas mediante citometría de flujo mostraron que la estimulación de LPS aumentó significativamente la producción de citocinas inflamatorias en las células MG-63. IL-1 (1,200 pg/mL), IL-6 (600 pg/mL), IL-8 (9,295 pg/mL), IL-10 (0.2 pg/mL), IL-12p70 (0.5 pg/mL), TNF- $\alpha$  (313.69 pg/mL).

Todos los tratamientos y su combinación mostraron una actividad anti-inflamatoria al reducir de manera significativa las concentraciones de algunas citocinas como se explica a continuación. Cuando el LPS fue combinado con HA/Ag disminuyó la producción de IL-1 (968.2 pg/mL), IL-8 (4,516.03 pg/mL) and TNF- $\alpha$  (207 pg/mL). Aunque la HA/Ag indujo la producción de IL-8 (2,624 pg/mL), IL-10 (12.54 pg/mL) and TNF- $\alpha$  (128 pg/mL) a 24 h. El ICRP mostró un efecto similar cuando se incubó junto con LPS la concentración de IL-1 (275 pg/mL) IL-6 (302 pg/mL) IL-8 (3652.5 pg/mL) y TNF- $\alpha$  (122 pg/mL) disminuyeron. Esta característica se mantiene también en los nanocompuestos de HA/Ag-ICRP con LPS, IL-1 (427 pg/mL), IL-6 (312 pg/mL), IL-8 (3978.48) y TNF- $\alpha$  (214 pg/mL) (Fig. 21 a) a 24 h.

Después de 48 horas el LPS estimuló la producción de IL-6 a (110 pg/ml) después de incubación con el LPS e HA/Ag el tratamiento mostró una reducción significativa de IL-6 (110 pg/ml) con el tratamiento de ICRP disminuyó a 42 pg/ml. Un efecto similar se

observó cuando se combinó el compuesto de fosfato de calcio con plata (HA/Ag con ICRP y LPS que disminuyó a 41 pg/ml (Fig. 21 b).

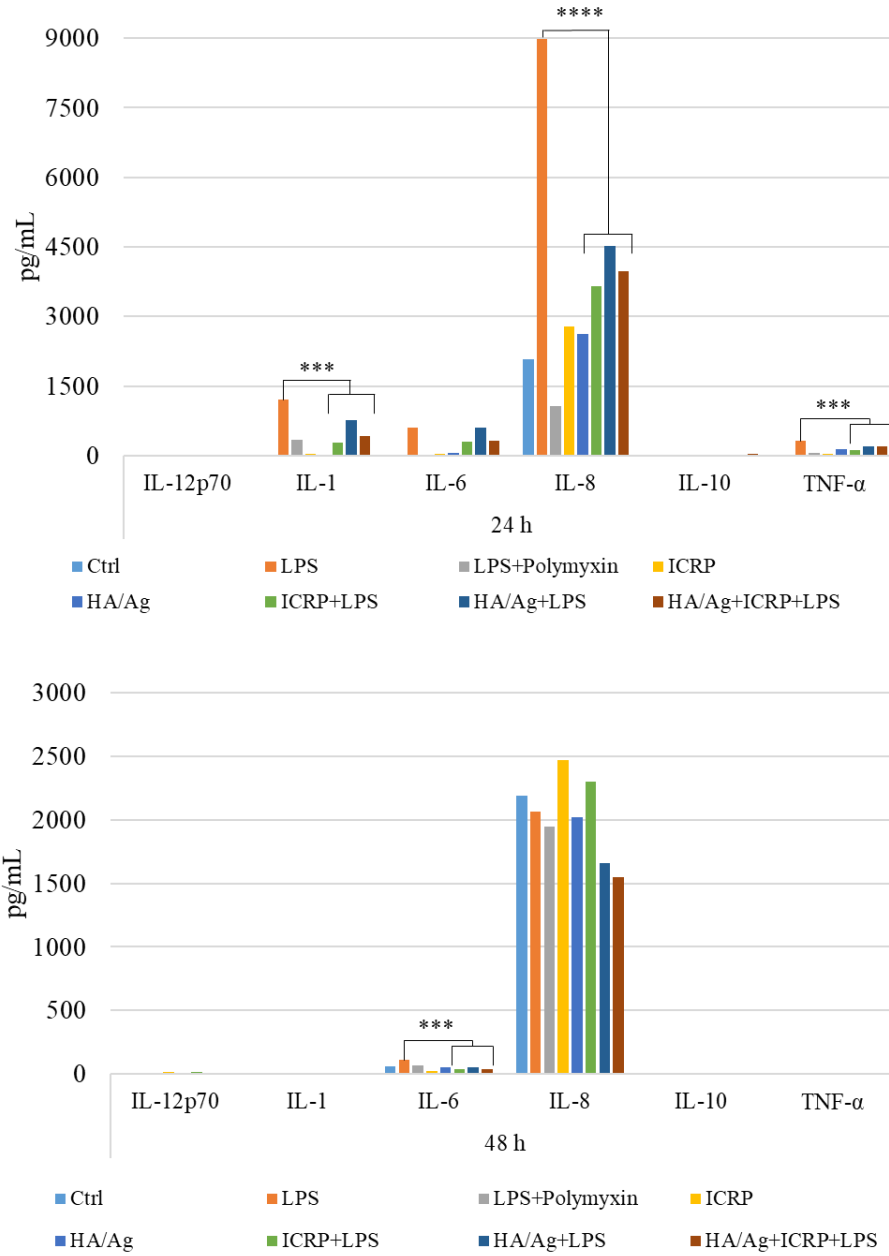


Figura 21.- Nanocompuestos modulan la producción de citocinas proinflamatorias en células MG-63 estimuladas con LPS. \*\*\*\*p < 0.0001 y \*\*\* p < 0.001.



## Hinchamiento y degradación de los nanocompuestos

Los materiales poliméricos experimentan deterioro mediante interacciones con el ambiente. El porcentaje de hinchamiento de las películas de los geles está relacionado con la absorción de líquidos, y por consecuencia el transporte de nutrientes.

Las películas de Qts presenta porcentajes de hinchamiento alrededor de 495%, en comparación con las demás formulaciones de Qts-ICRP con un porcentaje de hinchamiento del 354 %, un 314% y 166% para Qts-HA/Ag y Qts-HA/Ag-ICRP respectivamente, las propiedades hidrofóbicas afectaron la porosidad de la estructura de la película, lo que redujo la capacidad de absorción de agua, en comparación con la película de Quitosano (Fig. 22).

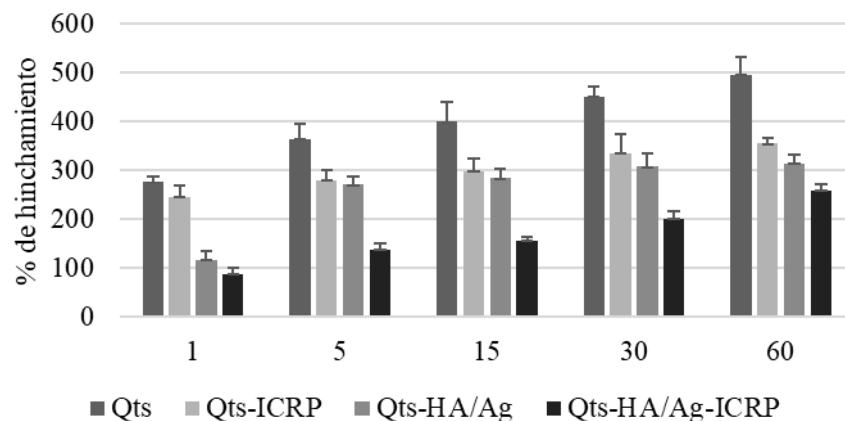


Figura 22. Porcentaje de hinchamiento de películas de Qts, Qts-ICRP y Qts-ICRP-HA/Ag. La absorción de nutrientes está en función al porcentaje de hinchamiento. El compuesto con partículas cerámicas aumento 259 % a los 60 minutos de incubación.

El porcentaje de degradación de las películas de Qts-ICRP- HA/Ag mejoró la estabilidad, da lugar a una mayor densidad de reticulación con la microestructura más compacta, menos contenido de agua y menos pérdida de masa. Los 5 días la película de Qts se degradó un 17% y el compuesto completo 11.67% a los 30 días la degradación aumento a un 61% y un 50.67 respectivamente. Las propiedades fisicoquímicas del biomaterial se

pueden ver afectadas por las condiciones donde haya sido implantado por el transcurso del tiempo (Fig 23).

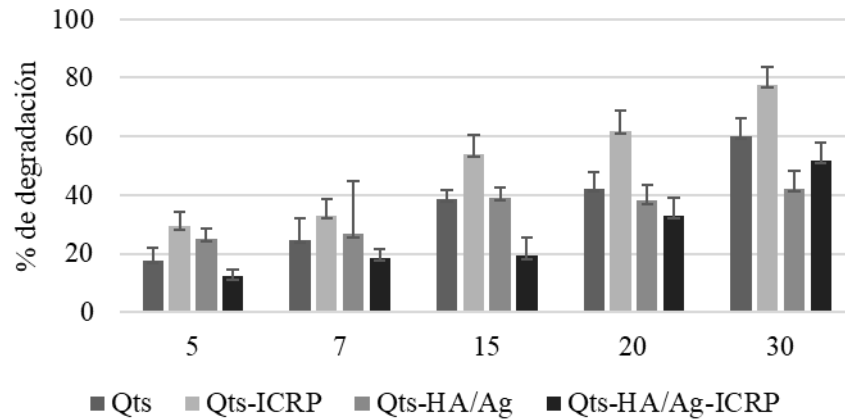


Figura 23. Porcentaje de degradación de películas de Qts, Qts-ICRP y Qts-ICRP-HA/Ag. La estabilidad de las películas se mide por la pérdida de masa respecto al tiempo. Después de 30 días de incubación el compuesto q-ICRP-HA/Ag 50% en comparación con el polímero.

### Ensayo de regeneración en un modelo *in vivo*

La cirugía *in vivo* se llevó a cabo en ratas Wistar. No hubo extracción del material y los animales 24 horas después de la intervención quirúrgica estaban en condiciones de ingerir alimento blando y agua (Fig. 24).

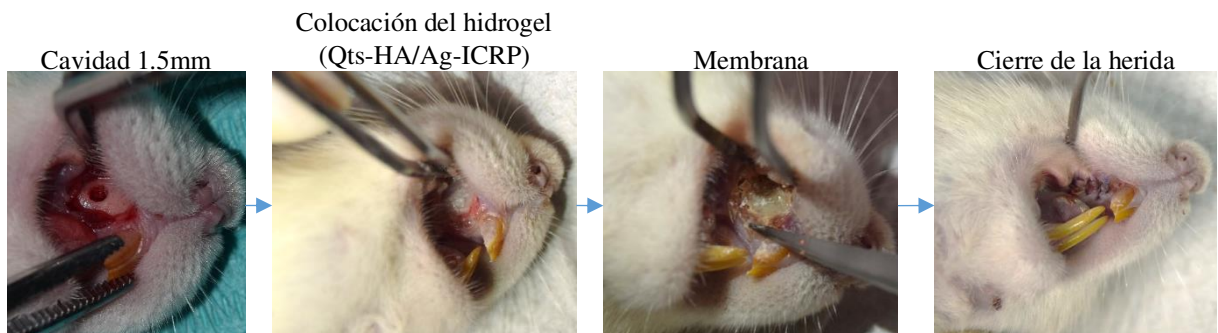


Figura 24. Proceso de colocación de injerto de Qts-ICRP-HA/Ag. Después de la colocación del injerto los animales fueron monitoreados para revisar el estado de la herida Sangrados, extracción del material.

La histología de los diferentes grupos en los dos periodos de tiempo muestra una regeneración más avanzada en los grupos con partículas de HA/Ag, a los 15 días se observa material mineralizado de forma irregular en comparación con los otros grupos donde aún hay zonas con tejido conectivo o fibroso. A los 28 días este mismo grupo muestra la presencia de osteocitos y sistema de Havers evidenciando una mineralización aún más avanzada (Fig. 25).

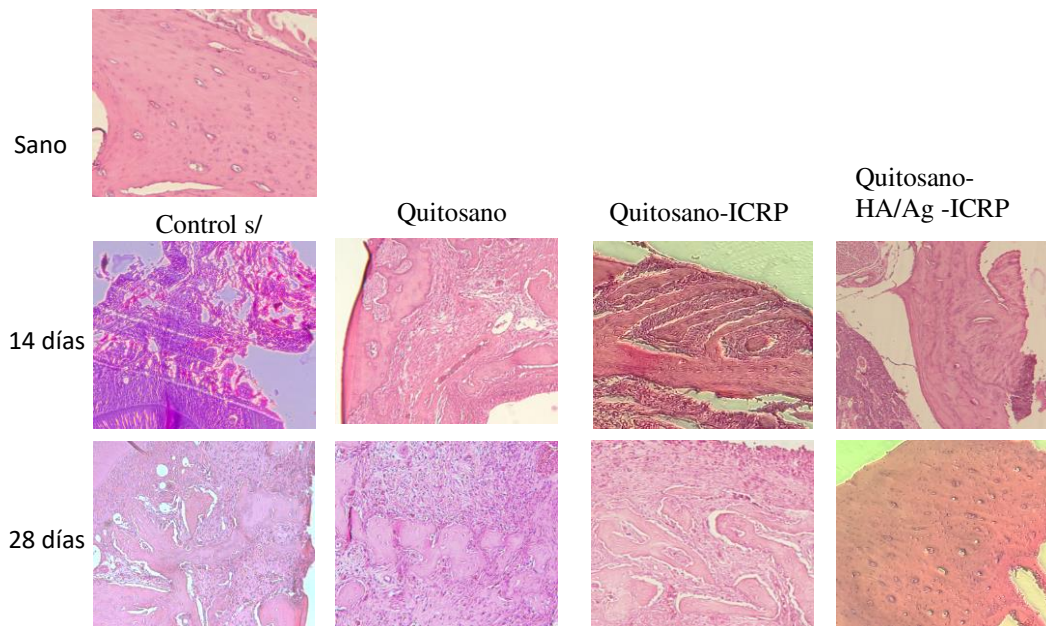


Figura 25. Análisis histológico del proceso de regeneración en un modelo de rata. Los grupos con partículas de HA/Ag muestran una densidad ósea más avanzada a los 14 y 28 días, en comparación con los otros grupos donde aún hay zonas con áreas de tejido conectivo. Tinción H y E, 40X.

## DISCUSIÓN

El polvo de HA reveló morfologías irregulares similares a las sintetizadas por Vukomanovic, M., et al. De acuerdo con la difracción de rayos X, los ángulos de 25.8 °, 31.7 °, 32.1 ° y 32.7 ° son los de mayor intensidad de acuerdo con la carta cristalográfica JCPDS. 9-0432; Además, en las micrografías de SEM se observaron nanopartículas de plata de 23 nm adheridas a la superficie de la hidroxiapatita. La formación de plata metálica fue confirmada por XRD la aparición de los ángulos 38.1 ° y 44.3 ° que corresponden a plata cúbica de acuerdo con el JCPDS. 04-0783 (Vukomanović, Bračko et al. 2011). El espectro FT-IR mostró las bandas características de HA como se informa en la literatura (Jansen and Leon 2009). La incorporación de Ag reveló una disminución significativa de las bandas relacionadas con OH<sup>-</sup> (3456, 3222 cm<sup>-1</sup>) y los principales grupos funcionales de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (1088 cm<sup>-1</sup>) CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (1666, 1629, 1461, 1343 cm<sup>-1</sup>); estos cambios observados sugieren una interacción de los iones de plata y estos radicales de HA (Badrou, Sadel et al. 1998; Vukomanović, Bračko et al. 2011).

En los resultados de XPS se identificó la presencia de los elementos presentes característicos de la fase de hidroxiapatita e hidroxiapatita/plata (tabla 1), estos elementos presentes en la muestra de HA/Ag concuerdan con los análisis de XRD, FTIR y EDS. De acuerdo con la energía de enlace (BE) encontrada para Ca, P, O y C de ambas muestras, se observó que hay un ligero cambio de BE más bajo en la muestra de HA dopada con Ag, esto podría deberse a la incorporación de Ag<sup>+</sup> en la estructura de la HA. Puede ser explicado considerando la diferencia en los tamaños de radio entre Ca<sup>2+</sup> y Ag<sup>+</sup> (Qi, Huang et al. 2018; Yuan, Xu et al. 2018). Además, la incorporación de los iones Ag en la estructura también es evidente en el espectro para HA / Ag (Fig. 5), con la contribución a 373.02 y 368.69 eV, que corresponde a Ag3d<sup>5/2</sup> y Ag3d<sup>3/2</sup> respectivamente, y estos concuerdan con los valores reportados (Ciobanu, Ilisei et al. 2014; Qi, Huang et al. 2018; Yuan, Xu et al. 2018).

La bioactividad es una propiedad deseada en biomateriales diseñados para la regeneración de tejidos óseos. La prueba de bioactividad en solución SBF demostró que nuestros polvos HA/Ag pueden inducir la nucleación y precipitación de Ca y P con la morfología típica

de HA. Los resultados de SEM-EDS indican que HA/Ag después de la inmersión en SBF experimenta cambios estructurales característicos en el proceso de formación de apatita. El primer cambio es el crecimiento de una capa rica en Ca. El segundo cambio estructural se basa en la interacción de la superficie rica en Ca con iones negativos como el fosfato para formar una capa pobre en Ca. Luego, la capa se cristaliza para formar apatita. Este proceso conduce a cambios en la relación Ca/P debido al intercambio iónico (Kim, Himeno et al. 2004). Este proceso ocurre de manera cíclica, comienza con la formación de fosfato de calcio amorfo que luego se modifica formando fases intermedias como TCP (1.5), OCP (1.33) y finalmente se transforma en HA (Li and Chang 2008; Lewandowska-Łańcucka, Fiejdasz et al. 2015).

El cambio en la estructura de la superficie de HA/Ag revela la interacción electrostática de HA/Ag con los iones de calcio y fosfato en el SBF; Estos elementos son los principales constituyentes de la fase mineral en el hueso natural. En el caso de nuestros polvos HA/Ag, la relación Ca/P fue más cercana a 1.67, que es el valor de la hidroxiapatita estequiométrica. Este estudio confirma la capacidad de HA/Ag para promover la mineralización / nucleación de apatita *in vitro*. Por otro lado, la adición de Ag no afectó la formación de la estructura de hidroxiapatita; además, Se han reportado estudios donde muestran que nanopartículas de plata de 20 nanómetros tienen actividad osteogénica en las células madre derivadas de tejido urinario, aumentando la producción de proteínas osteogénicas como la osteocalcina, fosfatasa alcalina, proteína morfogénica ósea y el factor de transcripción RUNX2 (Zhang, Liu et al. 2016).

La plata es conocida por sus fuertes propiedades antimicrobianas contra bacterias, gram positivos y gram negativas, virus y hongos (Wright, Lam et al. 1999; Lara, Garza-Treviño et al. 2011). Es por eso, que se usa ampliamente para limitar el crecimiento de microorganismos en medicina, odontología (Lara, Garza-Treviño et al. 2011; Simchi, Tamjid et al. 2011; Noronha, Paula et al. 2017) y en otros campos (Benn and Westerhoff 2008). Las interacciones entre HA/Ag y las células humanas se han estudiado y confirman (Ciobanu, Iconaru et al. 2013) que las concentraciones más bajas son altamente compatibles con las células de osteosarcoma (OS U-2) y fibroblastos de pulmón fetal (IMR-90), sin embargo las concentraciones más altas (5-10% en peso) de Ag en la HA muestra un efecto tóxico capaz de inducir cambios morfológicos similares a los

observados en infecciones bacterianas (Vukomanović, Bračko et al. 2011). En nuestro estudio, los nanocompuestos HA/Ag obtenidos con 0,1% de plata nanométrica mostraron un 80% de actividad antimicrobiana contra *E.coli*, un 85% contra MRSA y 63% contra *C. albicans* en concentraciones de 7 µg/mL, en contraste con los reportes de Costescu et al,(Costescu, Ciobanu et al. 2013) donde la HA dopada con iones de plata inhibió el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, *Candida krusei*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, pero las concentraciones más altas (5 mg/ml) (Liu, Mou et al. 2013).

El efecto en la viabilidad de diferentes líneas células frente a HA/Ag, se ha evaluado *in vitro* en osteoblastos humanos y en ratón (Choi, Cho et al. 2004; Singh, Dubey et al. 2011; Fielding, Roy et al. 2012; Singh, Kim et al. 2015; Shi, Gao et al. 2016), células madre humanas (Thian, Lim et al. 2012) y fibroblastos de ratón (Lee, Whang et al. 2006), así como en estudios *in vivo* en ratas que implican la implantación de HA/Ag en estructuras óseas. En nuestros resultados obtuvimos un 100% de viabilidad en células MG-63 tratadas con 7 µg/ml de HA/Ag que contiene 0.01% de plata nanométrica. El aumento de la concentración y la tasa de liberación de iones de plata produce un impacto negativo en los tejidos, inhibiendo su crecimiento y desarrollo. Choi et al. demostraron que los polvos de HA dopados con 0.15% de Ag iónica eran levemente tóxicos, mientras que las concentraciones de HA dopados con 1.5 y el 4.3% de Ag eran moderadamente tóxicos (Choi, Cho et al. 2004). Otros experimentos con osteoblastos humanos (hFOB) mostraron que la hidroxiapatita con un contenido de plata del 6% en peso con partículas de 150-212 µm utilizado como recubrimiento en titanio puro, inhibe significativamente el crecimiento de los osteoblastos y provoca la muerte de algunos de ellos. Mientras otros reportes indican que la HA que contenía un 2% y 4% de Ag permiten un buen equilibrio entre la actividad antimicrobiana y efectividad citotóxica (Fielding, Roy et al. 2012).

La inducción de la resorción ósea está relacionada en parte con la presencia de bacterias y LPS (Lieder, Petersen et al. 2013). La infección microbiana produce una variedad de productos tales como NO y citocinas que provocan una respuesta en el huésped que consiste en la expresión de varias moléculas de señalización y el reclutamiento de células inflamatorias. Este proceso puede culminar en la destrucción del tejido e interferir con la

regeneración y reparación del tejido óseo (Harrison, Kleinert et al. 1998; Graves and Cochran 2003; Mountziaris and Mikos 2008). La producción de NO está asociada con la pérdida ósea en algunas afecciones inflamatorias, lo que lleva a la osteoclastogénesis, favoreciendo así la resorción ósea (Ilyas, Odatsu et al. 2016; Pandey, Mídhá et al. 2018). Los niveles elevados de TNF- $\alpha$  e IL-1 están directamente relacionados con la destrucción ósea. También se ha demostrado que TNF- $\alpha$  e IL-1 inhiben la síntesis de colágeno, y retrasan la formación de hueso a través de la inhibición de la diferenciación de los osteoblastos y la supresión de la función de los osteoblastos. Se ha demostrado que la IL-6 aumenta en la osteoclastogénesis al regular la diferenciación de las células progenitoras en osteoclastos (Harrison, Kleinert et al. 1998; Bronner, Farach-Carson et al. 2006).

Debido a los riesgos asociados con las endotoxinas (LPS) en biomateriales y dispositivos médicos, la cantidad de endotoxinas no debe exceder de 0,5 EU / mL, según las pautas de la Administración de Alimentos y Alimentos de EE. UU. (FDA). La detección de la concentración LPS en las muestras de HA/Ag obtenidas para este estudio muestra que la concentración de LPS está por debajo de 0,06 EU / mL de acuerdo al ensayo de LAL (Gorbet and Sefton 2005; Dobrovol'skaia, Neun et al. 2010) que rechaza el efecto pro-inflamatorio por contaminación con endotoxinas.

Cuando nuestros polvos de HA/Ag se incubaron en combinación con LPS, la producción de NO y las citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 inducida por LPS a las 24 h y la IL-6 a las 48 h se atenuaron significativamente. Este efecto puede explicarse por modificaciones estructurales de LPS debido a la interacción de HA y sus componentes moleculares que inhiben la formación de enlaces con grupos reactivos del LPS y su actividad inflamatoria. Ansari et al. informaron la interacción por ATR-FTIR de biomoléculas bacterianas como LPS, un componente principal de la pared celular de las bacterias gramnegativas, y la L-a-fosfatidil-etanolamina (PE) el principal fosfolípido de la membrana externa bacteriana con nanopartículas de plata (AgNP). El espectro IR de LPS mostró cambios en el enlace de hidrógeno en el antígeno O del LPS después de la exposición con nanopartículas de Ag. Además, se ha reportado que la estabilidad del LPS disminuye por la adición de iones  $\text{Ca}^{2+}$  que se unen a  $\text{PO}_4^-$  en la región del lípido A. Es probable que el LPS pierda propiedades anfífilas debido a los cambios estructurales

inducidos por las nanopartículas de Ag y el  $\text{Ca}^{2+}$  contenido en la HA/Ag (Parikh and Chorover 2008; Ansari, Khan et al. 2014).

El IMMUNEPOTENT-CRP® es un extracto dializable de leucocitos murinos, contiene factores de transferencia que actúan como inmunomodulador. Se ha reportado que el ICRP a concentraciones de 0.05-0.5 U/ml posee propiedades antioxidantes al disminuir la producción de NO, y a concentraciones de 0.5 U/ml modula la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 ambas actividades reportadas sobre células de macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS (Franco-Molina, Mendoza-Gamboa et al. 2004; Franco-Molina, Mendoza-Gamboa et al. 2011). Este efecto fue similar al reportado en este estudio tratadas con ICRP a concentraciones de 0.1 U/ml disminuyó producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  IL-1 e IL-6) y la producción de óxido al ser estimuladas con LPS, sin afectar la viabilidad celular.

Cuando el ICRP se combinó con la HA/Ag mantuvo las mismas propiedades, aunque no se observa un efecto sinérgico o aditivo la disminución de las citocinas IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  producidas por células MG-63 estimuladas con LPS disminuyen de manera significativa.

Los biomateriales óseos con capacidad para modular el ambiente inmunológico local permiten incrementar la funcionalidad y eficiencia de los procesos celulares responsables de la regeneración ósea.



## CONCLUSIONES

Los resultados experimentales sugieren que nuestro método de síntesis modificado permitió la incorporación de nanopartículas de plata en la superficie de la hidroxiapatita. El nanocompuesto de HA/Ag demostró tener capacidad bioactiva y actividad antimicrobiana contra los microorganismos analizados (*E.coli*, *C. albicans* y MRSA) con bajas concentraciones de plata sin afectar la viabilidad celular. Además, la combinación del nanocompuesto de HA/Ag con ICRP atenúa el efecto inflamatorio, disminuyendo la producción de óxido nítrico y citocinas proinflamatorias inducidas con LPS en células MG-63 (IL-1 y TNF- $\alpha$ ). Y favorece su capacidad para inducir una regeneración de tejido óseo *in vitro* aumentando la producción de proteínas asociadas a la regeneración ósea (Osteocalcina, Runx2, TGF- $\beta$  y en un modelo *in vivo* de rata.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aichelmann-Reidy, M. E. and M. A. Reynolds (2008). "Predictability of clinical outcomes following regenerative therapy in intrabony defects." Journal of periodontology **79**(3): 387-393.
- Aina, V., G. Lusvardi, et al. (2012). "Magnesium-and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effects of doped-ions on the structure and chemico-physical properties." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **23**(12): 2867-2879.
- Ansari, M. A., H. M. Khan, et al. (2014). "Interaction of silver nanoparticles with Escherichia coli and their cell envelope biomolecules." Journal of basic microbiology **54**(9): 905-915.
- Ashman, A. (2000). "Postextraction ridge preservation using a synthetic alloplast." Implant dentistry **9**(2): 168&hyphen.
- Badrou, L., A. Sadel, et al. (1998). Synthesis and physical and chemical characterization of Ca<sub>10-x</sub>Ag<sub>x</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2-2x</sub> apatites. Annales de Chimie Science des Matériaux, Elsevier.
- Baek, W. and J. Kim (2010). "Transcriptional regulation of bone formation." Frontiers in bioscience (Scholar edition) **3**: 126-135.
- Barrere, F., T. Mahmood, et al. (2008). "Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions." Materials Science and Engineering: R: Reports **59**(1): 38-71.
- Benn, T. M. and P. Westerhoff (2008). "Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics." Environmental science & technology **42**(11): 4133-4139.
- Bons, N., S. Lehmann, et al. (2002). "Brain and buffy coat transmission of bovine spongiform encephalopathy to the primate *Microcebus murinus*." Transfusion **42**(5): 513-516.
- Bronner, F., M. C. Farach-Carson, et al. (2006). Bone resorption, Springer.
- Calvi, L., G. Adams, et al. (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." Nature **425**(6960): 841-846.
- Ciobanu, C. S., S. L. Iconaru, et al. (2013). "Synthesis and antimicrobial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles." BioMed research international **2013**.
- Ciobanu, G., S. Ilisei, et al. (2014). "Hydroxyapatite-silver nanoparticles coatings on porous polyurethane scaffold." Materials Science and Engineering: C **35**: 36-42.
- Comín M, P. J. (1999). "Comportamiento mecánico del tejido óseo. In: Instituto de Biomecánica de Valencia." Biomecánica de la fractura ósea y técnicas de reparación.
- Cortizo, A. M., M. S. Molinuevo, et al. (2006). "Osteogenic activity of vanadyl (IV)-ascorbate complex: Evaluation of its mechanism of action." The international journal of biochemistry & cell biology **38**(7): 1171-1180.
- Costescu, A., C. Ciobanu, et al. (2013). "Fabrication, characterization, and antimicrobial activity, evaluation of low silver concentrations in silver-doped hydroxyapatite nanoparticles." Journal of Nanomaterials **2013**: 5.
- Chen, G., C. Deng, et al. (2012). "TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation." Int J Biol Sci **8**(2): 272-288.

- Chen, Q. and G. A. Thouas (2015). "Metallic implant biomaterials." Materials Science and Engineering: R: Reports **87**: 1-57.
- Choi, J., H. M. Cho, et al. (2004). Effect of Ag-doped hydroxyapatite as a bone filler for inflamed bone defects. Key Engineering Materials, Trans Tech Publ.
- Dobrovolskaia, M. A., B. W. Neun, et al. (2010). "Ambiguities in applying traditional Limulus amoebocyte lysate tests to quantify endotoxin in nanoparticle formulations." Nanomedicine **5**(4): 555-562.
- Eastoe, J., M. J. Hollamby, et al. (2006). "Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles." Advances in colloid and interface science **128**: 5-15.
- Erdemci, F., Y. Gunaydin, et al. (2014). "Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats." International journal of oral and maxillofacial surgery **43**(6): 777-783.
- Ericsson, I., T. Berglundh, et al. (1992). "Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog." Clinical oral implants research **3**(3): 99-103.
- Fathi, M., A. Hanifi, et al. (2008). "Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder." Journal of materials processing technology **202**(1): 536-542.
- Feng, X. and J. M. McDonald (2011). "Disorders of bone remodeling." Annual review of pathology **6**: 121.
- Fielding, G. A., M. Roy, et al. (2012). "Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings." Acta biomaterialia **8**(8): 3144-3152.
- Franco-Molina, M., E. Mendoza-Gamboa, et al. (2007). "Bovine dialyzable leukocyte extract modulates cytokines and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated human blood cells." Cytotherapy **9**(4): 379-385.
- Franco-Molina, M., E. Mendoza-Gamboa, et al. (2006). "In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells." Cytotherapy **8**(4): 408-414.
- Franco-Molina, M. A., E. Mendoza-Gamboa, et al. (2004). "Bovine dialyzable leukocyte extract protects against LPS-induced, murine endotoxic shock." International immunopharmacology **4**(13): 1577-1586.
- Franco-Molina, M. A., E. Mendoza-Gamboa, et al. (2005). "Bovine dialyzable leukocyte extract modulates the nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated murine peritoneal macrophages in vitro." Journal of medicinal food **8**(1): 20-26.
- Franco-Molina, M. A., E. Mendoza-Gamboa, et al. (2011). "Anti-inflammatory and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages." African Journal of Microbiology Research **5**(22): 3726-3736.
- Geusens, P. and W. F. Lems (2011). "Osteoimmunology and osteoporosis." Arthritis research & therapy **13**(5): 1-16.
- Giannoudis, P. V., H. Dinopoulos, et al. (2005). "Bone substitutes: an update." Injury **36**(3): S20-S27.
- Gorbet, M. B. and M. V. Sefton (2005). "Endotoxin: the uninvited guest." Biomaterials **26**(34): 6811-6817.
- Götz, H., M. Müller, et al. (2004). "Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants." Biomaterials **25**(18): 4057-4064.

- Graves, D. T. and D. Cochran (2003). "The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction." Journal of periodontology **74**(3): 391-401.
- Harrison, J. R., L. M. Kleinert, et al. (1998). "Interleukin-1 represses COLIA1 promoter activity in calvarial bones of transgenic ColCAT mice in vitro and in vivo." Journal of Bone and Mineral Research **13**(7): 1076-1083.
- Heino, T. J. and T. A. Hentunen (2008). "Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells." Current stem cell research & therapy **3**(2): 131-145.
- Higashi, Y., S. Sukhanov, et al. (2012). "Aging, atherosclerosis, and IGF-1." The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences: gls102.
- Ianeselli, L., F. Zhang, et al. (2010). "Protein–protein interactions in ovalbumin solutions studied by small-angle scattering: effect of ionic strength and the chemical nature of cations." The Journal of Physical Chemistry B **114**(11): 3776-3783.
- Ilyas, A., T. Odatsu, et al. (2016). "Amorphous silica: A new antioxidant role for rapid critical-sized bone defect healing." Advanced healthcare materials **5**(17): 2199-2213.
- Jansen, J. A. and B. Leon (2009). Thin calcium phosphate coatings for medical implants, Springer.
- Jin, Q., H. Takita, et al. (2000). "Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation." Journal of biomedical materials research **51**(3): 491-499.
- Jung, R. E., B. E. Pjetursson, et al. (2008). "A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns." Clinical oral implants research **19**(2): 119-130.
- Kaigler, D. and D. Mooney (2001). "Tissue engineering's impact on dentistry." Journal of dental education **65**(5): 456-462.
- Kim, H.-M. (2003). "Ceramic bioactivity and related biomimetic strategy." Current opinion in solid state and materials science **7**(4): 289-299.
- Kim, H.-M., T. Himeno, et al. (2004). "The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment." Journal of the Royal Society Interface **1**(1): 17-22.
- Kim, H. W., J. C. Knowles, et al. (2005). "Porous scaffolds of gelatin–hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: characterization and antibiotic drug release." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **74**(2): 686-698.
- Kim, J.-H., H.-J. Moon, et al. (2013). "A novel in vivo platform for studying alveolar bone regeneration in rat." Journal of tissue engineering **4**: 2041731413517705.
- Kim, J. S., E. Kuk, et al. (2007). "Antimicrobial effects of silver nanoparticles." Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine **3**(1): 95-101.
- Kivrak, N. and A. C. Taş (1998). "Synthesis of Calcium Hydroxyapatite-Tricalcium Phosphate (HA-TCP) Composite Bioceramic Powders and Their Sintering Behavior." Journal of the American Ceramic Society **81**(9): 2245-2252.
- Kokubo, T. and H. Takadama (2006). "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?" Biomaterials **27**(15): 2907-2915.

- Kotake, S. and Y. Nanke (2014). "Effect of TNF $\alpha$  on osteoblastogenesis from mesenchymal stem cells." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1840**(3): 1209-1213.
- Landi, E., A. Tampieri, et al. (2005). "Nucleation of biomimetic apatite in synthetic body fluids: dense and porous scaffold development." Biomaterials **26**(16): 2835-2845.
- Lara, H. H., E. N. Garza-Treviño, et al. (2011). "Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds." Journal of nanobiotechnology **9**(1): 30.
- Lee, I.-S., C.-N. Whang, et al. (2006). "Formation of silver incorporated calcium phosphate film for medical applications." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms **242**(1-2): 45-47.
- Lewandowska-Łańcucka, J., S. Fiejdasz, et al. (2015). "Bioactive hydrogel-nanosilica hybrid materials: a potential injectable scaffold for bone tissue engineering." Biomedical Materials **10**(1): 015020.
- Lewis, C. S., P. R. Supronowicz, et al. (2012). "Local antibiotic delivery with demineralized bone matrix." Cell and tissue banking **13**(1): 119-127.
- Li, X. and J. Chang (2008). "Preparation of bone-like apatite–collagen nanocomposites by a biomimetic process with phosphorylated collagen." Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials **85**(2): 293-300.
- Li, X., J. Xu, et al. (2013). "pHEMA-nHA encapsulation and delivery of vancomycin and rhBMP-2 enhances its role as a bone graft substitute." Clinical Orthopaedics and Related Research® **471**(8): 2540-2547.
- Li, Y., C. Yang, et al. (2014). "New developments of Ti-based alloys for biomedical applications." Materials **7**(3): 1709-1800.
- Lieder, R., P. H. Petersen, et al. (2013). "Endotoxins—the invisible companion in biomaterials research." Tissue Engineering Part B: Reviews **19**(5): 391-402.
- Liu, X., Y. Mou, et al. (2013). "Synthesis of silver-incorporated hydroxyapatite nanocomposites for antimicrobial implant coatings." Applied surface science **273**: 748-757.
- Lu, H., Y. Liu, et al. (2016). "Biomaterials with antibacterial and osteoinductive properties to repair infected bone defects." International journal of molecular sciences **17**(3): 334.
- Mahmood, M., Z. Li, et al. (2011). "Nanostructural materials increase mineralization in bone cells and affect gene expression through miRNA regulation." Journal of cellular and molecular medicine **15**(11): 2297-2306.
- Marie, P., P. Ammann, et al. (2001). "Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone." Calcified tissue international **69**(3): 121-129.
- Marie, P. J. and M. Kassem (2011). "Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets." European Journal of Endocrinology **165**(1): 1-10.
- Marin, S., G. Mihail Vlasceanu, et al. (2015). "Applications and toxicity of silver nanoparticles: a recent review." Current topics in medicinal chemistry **15**(16): 1596-1604.
- Mc Garrigle, M., C. Mullen, et al. (2016). "Osteocyte differentiation and the formation of an interconnected cellular network in vitro." Eur. Cells Mater **31**: 323-340.

- Mendonça, G., D. B. Mendonça, et al. (2008). "Advancing dental implant surface technology—from micron-to nanotopography." Biomaterials **29**(28): 3822-3835.
- Monroe, D. G., M. E. McGee-Lawrence, et al. (2012). "Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease." Gene **492**(1): 1-18.
- Moore, W. R., S. E. Graves, et al. (2001). "Synthetic bone graft substitutes." ANZ journal of surgery **71**(6): 354-361.
- Mountziaris, P. M. and A. G. Mikos (2008). "Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration." Tissue Engineering Part B: Reviews **14**(2): 179-186.
- Murugan, R. and S. Ramakrishna (2004). "Coupling of therapeutic molecules onto surface modified coralline hydroxyapatite." Biomaterials **25**(15): 3073-3080.
- Navarro Toro, M. (2005). Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea, Universitat Politècnica de Catalunya.
- Nayar, S., S. Bhuminathan, et al. (2011). "Upsurge of nanotechnology in dentistry and dental implants." Indian Journal of Multidisciplinary Dentistry **1**(5).
- Noor, Z. (2013). "Nanohydroxyapatite application to osteoporosis management." Journal of osteoporosis **2013**.
- Noronha, V. T., A. J. Paula, et al. (2017). "Silver nanoparticles in dentistry." Dental Materials **33**(10): 1110-1126.
- Norowski Jr, P. A. and J. D. Bumgardner (2009). "Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials **88**(2): 530-543.
- Ojeda, M. O., C. van't Veer, et al. (2005). "Dialyzable leukocyte extract differentially regulates the production of TNF $\alpha$ , IL-6, and IL-8 in bacterial component-activated leukocytes and endothelial cells." Inflammation Research **54**(2): 74-81.
- Ong, C., J. Lim, et al. (2013). "Silver nanoparticles in cancer: therapeutic efficacy and toxicity." Current medicinal chemistry **20**(6): 772-781.
- Palcevskis, E., A. Dindune, et al. (2011). The influence of surface treatment by hydrogenation on the biocompatibility of different hydroxyapatite materials. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, IOP Publishing.
- Pandey, A., S. Midha, et al. (2018). "Antioxidant and antibacterial hydroxyapatite-based biocomposite for orthopedic applications." Materials Science and Engineering: C **88**: 13-24.
- Parhi, P., A. Golas, et al. (2009). "Volumetric interpretation of protein adsorption: capacity scaling with adsorbate molecular weight and adsorbent surface energy." Biomaterials **30**(36): 6814-6824.
- Parikh, S. J. and J. Chorover (2008). "ATR-FTIR study of lipopolysaccharides at mineral surfaces." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **62**(2): 188-198.
- Petersen, P. E. and H. Ogawa (2012). "The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control." Periodontology 2000 **60**(1): 15-39.
- Pjetursson, B. E., K. Tan, et al. (2004). "A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years: I. Implant-supported FPDs." Clinical oral implants research **15**(6): 625-642.

- Qi, M.-l., Z. Huang, et al. (2018). "Facile hydrothermal synthesis of antibacterial multi-layered hydroxyapatite nanostructures with superior flexibility." CrystEngComm **20**(9): 1304-1312.
- Qin, H., C. Zhu, et al. (2014). "Silver nanoparticles promote osteogenic differentiation of human urine-derived stem cells at noncytotoxic concentrations." International journal of nanomedicine **9**: 2469.
- Reynolds, M. A., M. E. Aichelmann-Reidy, et al. (2010). "Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts." Dental Clinics of North America **54**(1): 55-71.
- Riches, P. L., E. McRorie, et al. (2009). "Osteoporosis associated with neutralizing autoantibodies against osteoprotegerin." New England Journal of Medicine **361**(15): 1459-1465.
- Riool, M., L. de Boer, et al. (2014). "Staphylococcus epidermidis originating from titanium implants infects surrounding tissue and immune cells." Acta biomaterialia **10**(12): 5202-5212.
- Rodriguez-Balderrama, I., P. Pérez-Martinez, et al. (2000). "Uso del factor de transferencia en recién nacidos con choque séptico." Med Univ **7**: 125-130.
- Roy, M., G. A. Fielding, et al. (2012). "Mechanical, in vitro antimicrobial, and biological properties of plasma-sprayed silver-doped hydroxyapatite coating." ACS applied materials & interfaces **4**(3): 1341-1349.
- Sandor, G., T. Lindholm, et al. (2003). "Bone regeneration of the cranio-maxillofacial and dento-alveolar skeletons in the framework of tissue engineering." Topics in tissue engineering **7**: 1-46.
- Shepherd, J. H., D. V. Shepherd, et al. (2012). "Substituted hydroxyapatites for bone repair." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **23**(10): 2335-2347.
- Shi, C., J. Gao, et al. (2016). "Functional hydroxyapatite bioceramics with excellent osteoconductivity and stern-interface induced antibacterial ability." Biomaterials science **4**(4): 699-710.
- Silver, S. (2003). "Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds." FEMS microbiology reviews **27**(2-3): 341-353.
- Simchi, A., E. Tamjid, et al. (2011). "Recent progress in inorganic and composite coatings with bactericidal capability for orthopaedic applications." Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine **7**(1): 22-39.
- Singh, B., A. K. Dubey, et al. (2011). "In vitro biocompatibility and antimicrobial activity of wet chemically prepared  $\text{Ca}_{10-x}\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  ( $0.0 \leq x \leq 0.5$ ) hydroxyapatites." Materials Science and Engineering: C **31**(7): 1320-1329.
- Singh, P., Y. J. Kim, et al. (2015). "Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles." International journal of nanomedicine **10**: 2567.
- Sowmya, S., P. S. Kumar, et al. (2011). "Biocompatible  $\beta$ -chitin hydrogel/nanobioactive glass ceramic nanocomposite scaffolds for periodontal bone regeneration." Trends Biomater. Artif. Organs **25**(1): 1-11.
- Tagaya, M., T. Ikoma, et al. (2011). "Effect of interfacial proteins on osteoblast-like cell adhesion to hydroxyapatite nanocrystals." Langmuir **27**(12): 7645-7653.
- Thian, E. S., P. Lim, et al. (2012). Silver-doped apatite as a bioactive and an antimicrobial bone material. Key Engineering Materials, Trans Tech Publ.

- Turbill, P., T. Beugeling, et al. (1996). "Proteins involved in the Vroman effect during exposure of human blood plasma to glass and polyethylene." Biomaterials **17**(13): 1279-1287.
- Vroman, L. and A. L. Adams (1969). "Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces." Surface Science **16**: 438-446.
- Vukomanović, M., I. Bračko, et al. (2011). "The growth of silver nanoparticles and their combination with hydroxyapatite to form composites via a sonochemical approach." Crystal Growth & Design **11**(9): 3802-3812.
- Wang, Y., X. Wang, et al. (2011). "Assessing the character of the rhBMP-2-and vancomycin-loaded calcium sulphate composites in vitro and in vivo." Archives of orthopaedic and trauma surgery **131**(7): 991-1001.
- Wheater, P. R. and B. Young (2006). Wheater's functional histology: a text and colour atlas, Churchill Livingstone.
- Wright, J., K. Lam, et al. (1999). "Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens." American journal of infection control **27**(4): 344-350.
- Yamaguchi, M. (1998). "Role of zinc in bone formation and bone resorption." The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine **11**(2-3): 119-135.
- Yuan, Q., A. Xu, et al. (2018). "Bioactive silver doped hydroxyapatite composite coatings on metal substrates: synthesis and characterization." Materials Chemistry and Physics **218**: 130-139.
- Zhang, X.-F., Z.-G. Liu, et al. (2016). "Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches." International journal of molecular sciences **17**(9): 1534.
- Zheng, Z., W. Yin, et al. (2010). "The use of BMP-2 coupled–Nanosilver-PLGA composite grafts to induce bone repair in grossly infected segmental defects." Biomaterials **31**(35): 9293-9300.
- Zhou, H. and J. Lee (2011). "Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering." Acta biomaterialia **7**(7): 2769-2781.



## RESUMEN BIOGRÁFICO

Juan José Martínez Sanmiguel

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SUSTITUTOS OSEOS BASADOS EN  
HIDROXIAPATITA, NANOPARTÍCULAS DE PLATA E IMMUNEPOTENT-CRP

Campo de Estudio: Ciencias de la salud, Biomateriales

Educación: Cirujano Dentista, Egresado de la Facultad de odontología UANL.

Maestro en ciencias con Orientación en Inmunobiología. Egresado de la Facultad de  
Ciencias Biológicas, UANL

Experiencia profesional: Docente