



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO: Nanopartículas de óxido de hierro  
para mecanotransducción**

Autor: Carlos Martínez Carpintero

Fecha: Septiembre 2020

Tutor: Isabel Izquierdo Barba

## ÍNDICE

<b>RESUMEN Y ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4-10</b>
<b>1.1 Mecanotransducción.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Regeneración ósea.....</b>	<b>5-8</b>
<b>1.3 Nanopartículas de óxido de hierro.....</b>	<b>9-10</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>11-20</b>
<b>5 CONCLUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>6 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>21-22</b>

## ABREVIATURAS

**IONP:** nanopartículas de óxido de hierro.

**ALP:** fosfatasa alcalina.

**hDPSC:** células madre de la pulpa dental humana.

**hBMSC:** células madre mesenquimales derivadas de huesos humanos.

**TEM:** microscopía electrónica de transmisión.

**SEM:** microscopía electrónica de barrido.

**XRD:** difracción de rayos X.

**OS:** suplementos inductores osteogénicos.

## **RESUMEN**

Actualmente el conocimiento de funciones celulares como proliferación, apoptosis y migración están adquiriendo una perspectiva interesante para los científicos. La mecanotransducción puede cumplir un papel importante en dichas funciones, de modo que terminen en repercutir en un desarrollo fisiológico adecuado, en la aparición de enfermedades o incluso en la mejora de procesos como la regeneración ósea. Por otro lado, la ciencia también está avanzando en el conocimiento de materiales de escala nanométrica, que por sus propiedades únicas pueden interaccionar con mecanismos celulares o desarrollar aplicaciones que mejoren la calidad de vida de las personas. Con este objetivo se están estudiando las nanopartículas de óxido de hierro y este trabajo se va a centrar en cómo estas nanopartículas pueden mejorar la capacidad de regeneración ósea del ser humano.

## **ABSTRACT**

Currently the knowledge of cellular functions such as proliferation, apoptosis and migration are gaining an interesting perspective for scientists. Mechanotransduction can play an important role in these functions, so that they end up having an impact on adequate physiological development, on the appearance of diseases or even on the improvement of processes such as bone regeneration. On the other hand, science is also advancing in the knowledge of nano-scale materials that, due to their unique properties, can interact with cellular mechanisms or develop applications that improve people's quality of life. With this objective, iron oxide nanoparticles are being studied and this work will focus on how these nanoparticles can improve human bone regeneration capacity.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Mecanotransducción

La mecanotransducción es el conjunto de procesos mediante los que las células transforman estímulos mecánicos (extracelulares) en señales bioquímicas (intracelulares) que posteriormente se integran en las respuestas celulares. De manera que pueden modular diversas funciones como migración, proliferación, diferenciación y apoptosis celulares, así como la homeostasis tisular. (1)

Los procesos mecanosensibles se caracterizan por poseer una gran amplitud, ya que la mayoría de componentes celulares pueden resistir y transmitir este tipo de fuerzas mecánicas. La transducción de fuerzas físicas puede producir cambios conformacionales de proteínas, mediar fosforilaciones, alterar actividades enzimáticas, propiciar la apertura de canales iónicos; de modo que intervendrán en procesos fisiológicos del organismo. (2)

La mecanotransducción tiene gran impacto en tejidos que suelen someterse a tensión mecánica como el óseo, muscular y cartilaginoso. El tejido óseo para garantizar una adecuada función mecánica, es capaz de responder a cargas estructurales, de forma que la mecanotransducción interviene en la reparación y regeneración ósea. (3)

Actualmente se cree que alteraciones en el ambiente extracelular como variaciones en las fuerzas mecánicas, deformaciones de tejidos, cambios en la matriz extracelular (MEC) que afectan a la rigidez o propiedades bioquímicas, variaciones en la organización y estructura de una célula, podrían influir en el desarrollo de enfermedades.

Algunos investigadores plantean que el flujo del líquido intersticial es el principal estímulo que reciben las células óseas. Este flujo se produce por la aplicación de tensión mecánica que causa la disminución del volumen de algunos poros y el aumento de otros. Los osteocitos al detectar el flujo, posteriormente producirán moléculas de señalización que regulan la resorción ósea mediada por osteoclastos y la formación ósea por osteoblastos. (3,4)

La activación mecánica de la mecanotransducción, que es un proceso biológico, complejo y diverso, puede influir a múltiples vías de señalización molecular a la vez, de modo que el estudio de vías específicas es difícil. Además existen vías clásicas como la ruta de la Proteína Quinasa Activada por Mitógenos (MAPK) que participan con varias vías de señalización. (1,3)

## 1.2 Regeneración ósea

El tejido óseo se caracteriza por su capacidad para formar tejido nuevo tras sufrir lesiones como fracturas. A diferencia de otros tejidos, en los que se crea un tejido cicatricial, en el tejido óseo se forma uno con la mayoría de las características previas al traumatismo. La regeneración ósea es el proceso que forma el hueso nuevo, y engloba una compleja cascada donde intervienen factores moleculares, fisiológicos y biomecánicos. (5)

### 1.2.1 Células óseas

En el tejido óseo hay varios tipos de células que intervienen activamente en el proceso de regeneración.

#### Osteoblastos

Son células que se localizan en la superficie ósea y proceden de células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea. La diferenciación osteoblástica está regulada por genes y factores de crecimiento. Destacando los genes de la familia Hedgehog (Indian Hedgehog – Ihh y Sonic Hedgehog- Shh), el factor de transcripción Cbfa 1 (Core binding factor a-1, o también Runx2) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP). (6)

Cbfa1 es un factor de transcripción específico para la osteogénesis, ya que influye en la diferenciación de células mesenquimales a células del linaje osteoblástico. (7)

Las BMP componen un grupo de 15 citocinas anabólicas que pertenecen a la familia TGF- $\beta$ . Las principales proteínas con carácter osteoinductor son BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7. Al ser osteoinductoras tienen la capacidad de inducir la mitogénesis de células madre mesenquimales y de favorecer su diferenciación a linaje osteoblástico. (5,8,9)

Proteína	Grupo	Función
<b>BMP 1</b>	Metaloproteasa	Coadyuvante en el desarrollo de cartilago, escinde el extremo carboxilo terminal del Procolágeno I, II y III <sup>11</sup> .
<b>BMP 2</b>	Súperfamilia TGF- $\beta$	Induce condrogénesis, osteogénesis y revascularización. Estimula la osteogénesis mediante la activación de la vía EIF2AK3-EIF2A - ATF4 <sup>12</sup> .
<b>BMP 4</b>	Súperfamilia TGF- $\beta$	Permite la activación de factores de transcripción SMAD's, influye en el desarrollo de cartilago y hueso. Tiene efecto sobre proliferación, apoptosis y movilidad celular <sup>13</sup> .
<b>BMP 7</b>	Súperfamilia TGF- $\beta$	Coadyuva en la diferenciación de células mesenquimales en condroblastos y osteoblastos. Induce la fosforilación de proteínas SMAD 1/5 <sup>9</sup> .
<b>BMP 8</b>	Súperfamilia TGF- $\beta$	Proteína osteoinductiva y condrogénica, pudiera estar involucrada en la osteogénesis epitelial <sup>12</sup> .
<b>BMP 14</b>	Factor de crecimiento de diferenciación (GDF5)	Participa en la condrogénesis, potencia la curación de tendones y la formación de hueso <sup>13</sup> .

(10)

Además existen más marcadores osteogénicos como colágeno 1, osteopontina (OPN), fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína (BSP) y osteocalcina (OCN).

La ALP es un marcador de formación y recambio óseo, ya que se relaciona directamente con la mineralización de la matriz ósea. (7)

Los osteoblastos sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, factores de crecimiento, dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, median la reabsorción llevada a cabo por osteoclastos mediante citoquinas específicas y contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide. (6,11)

### **Osteocitos**

Son células que proceden de la transformación de osteoblastos. A diferencia de los osteoblastos, los osteocitos están en el interior. Los osteocitos se organizan formando un sincitio de células interconectadas, que les permite satisfacer las necesidades de oxígeno y nutrientes.

Los osteocitos pueden controlar el remodelado óseo detectando las variaciones mecánicas de cargas (se encargan de la mecanotransducción). Aunque también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide. Constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse.

Poseen como marcador específico CD44, receptor de membrana que se expresa fuertemente en osteocitos y es negativo en osteoblastos y células limitantes. (6,11)

### **Osteoclastos**

Son células que proceden de células madre hematopoyéticas medulares llamadas Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (CFU-GM). Los osteoclastos realizan la reabsorción y pueden ser identificados por la presencia de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP).

Para la formación de osteoclastos participa el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF). Además se conocen otras moléculas que influyen en la osteoclastogénesis: la osteoprotegerina (OPG), receptor activador de NFκB ligando (RANKL) situado en la superficie de osteoblastos y preosteoblastos y el receptor de RANKL (RANK) situado en la membrana de osteoclastos y preosteoclastos. (6,11)

RANKL interacciona con su receptor RANK produciendo activación de la diferenciación osteoclástica y aumentando también la actividad de osteoclastos. Los efectos de RANKL son

inhibidos por OPG que es una proteína de la superfamilia de los receptores TNF producida por osteoblastos y preosteoblastos. OPG se une a RANKL de modo que impide la unión de RANKL con RANK impidiendo la activación de la diferenciación de osteoclastos. (6)

### **1.2.2 Evolución de procedimientos para regeneración ósea**

A lo largo de la historia se ha intentado reparar el daño causado en huesos de la mejor manera posible. Entre los procedimientos actuales están:

#### **Implantación de prótesis**

Las prótesis tienen el objetivo de restablecer el funcionamiento mecánico de los huesos. Sin embargo, presentan ciertos problemas que limitan su efectividad como la falta de osteointegración. Los materiales implantados interactúan muy poco con el tejido circundante, de modo que las fuerzas de roce causadas por el movimiento del paciente van desgastando el tejido óseo próximo a la prótesis y pueden llegar a provocar daños estructurales. (12)

#### **Injertos autólogos**

Son fragmentos de tejido óseo obtenidos de una zona sana, que se implantan en la zona dañada. Es el método más utilizado para sustituir y rellenar defectos óseos. Sus principales ventajas son que, al proceder del mismo individuo, no producen reacciones inmunes y se integran adecuadamente con el tejido circundante. Sin embargo, cuentan con poca disponibilidad, hecho que dificulta el tratamiento de defectos de gran tamaño. (12–14)

#### **Injertos alogénicos**

Son aquellos obtenidos de otro sujeto, generalmente cadáveres, de la misma especie. Pueden producir reacciones inmunes de rechazo, pero con las pruebas de compatibilidad adecuadas tienen altas posibilidades de integrarse bien en el huésped. A pesar de esto, existe la posibilidad de que puedan transmitir enfermedades. (12–14)

#### **Injertos xenogénicos**

Son aquellos que se obtienen de sujetos de especies diferentes, de modo que tienen altas posibilidades de producir reacciones inmunes graves de rechazo. (12,14)

Como alternativa está en continua investigación la aplicación de ingeniería de tejidos.

### 1.2.3 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es la disciplina que se centra en el desarrollo de sustitutos biológicos denominados biomateriales, con el objetivo de reparar y guiar la regeneración ósea tras su implantación en la zona lesionada. Se basa en que la regeneración de nuevo tejido puede ser guiada por la combinación de células, biomateriales y moléculas bioactivas. (12,14,15)

Los **biomateriales** o **andamios**: constituyen una matriz sobre la que pueden asentarse células osteogénicas que formarán nuevo tejido óseo. Para cumplir de forma eficaz su función, es preciso atender a ciertas características:

**Osteoconductividad**: capacidad para actuar como soporte estructural en la formación de tejido óseo nuevo.

**Osteoinductividad**: capacidad de inducir la migración y la diferenciación celular. Con esta característica se permite reclutar células madre mesenquimales y osteoprogenitoras para que después proliferen y se diferencien a un linaje osteogénico. (16)

**Biocompatibilidad**: integración adecuada al tejido, de modo que no se produzcan efectos citotóxicos, genotóxicos o reacciones de hipersensibilidad.

**Biodegradabilidad**: capacidad de una sustancia de degradarse sin generar productos tóxicos. El objetivo ideal es conseguir que a medida que se va formando nuevo hueso, se vaya degradando el biomaterial sin producir efectos tóxicos.

**Resistencia y compatibilidad mecánica**: el material debe ser capaz de resistir cargas mecánicas en función del tejido óseo al que reemplaza. Se buscan propiedades como rigidez, elasticidad, resistencia a la fractura que asemejen lo máximo posible al hueso reemplazado. (15,17)

Hoy día se emplean andamios de diferentes materiales como hidroxiapatita (HA) y fosfatos de calcio [cerámicas], derivados del ácido poliglicólico (PGA), derivados del ácido poliláctico (PLA) [polímeros]... (12,17)

### **1.3 Nanopartículas de óxido de hierro**

Actualmente en el ámbito científico se está investigando sobre la nanotecnología con el objetivo de desarrollar diversas aplicaciones que mejoren la calidad de vida de las personas. Las nanopartículas son partículas que presentan un tamaño comprendido entre 1 y 100 nanómetros (nm), y se caracterizan por poseer propiedades significativamente diferentes. (18) La mayoría de IONP presentan estructura cristalina, cuyo grado de orden y tamaño se pueden controlar en función de las condiciones de síntesis. Sus pequeños tamaños permiten interactuar con entidades biológicas de interés, y además pueden ser manipuladas mediante la aplicación de un campo magnético externo. (19,20)

De modo que son objeto de estudio para múltiples aplicaciones como diagnóstico por imagen, hipertermia por fluido magnético, orientación magnética de fármacos, agente terapéutico, marcaje celular, reparación de tejidos... (21)

Las formas más comunes de óxido de hierro que se están investigando son hematita ( $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), maghemita ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) y magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). (18,22)

#### **1.3.1 Síntesis**

En función del método empleado se conseguirá obtener nanopartículas con características estructurales diferentes (cristalinidad, tamaño, forma, dispersabilidad), de modo que pueden influir en sus propiedades (eléctricas, magnéticas, mecánicas) terminando por determinar su comportamiento para distintas aplicaciones. (18)

Existen varios tipos de métodos: físicos, químicos y biológicos. Los métodos físicos no suelen conseguir controlar el tamaño de partículas a escala nanométrica. Los biológicos se consideran adecuados para el medio ambiente y producen nanopartículas con alta biocompatibilidad, pero presentan rendimientos bajos y necesitan mucho tiempo para llevarse a cabo. Por tanto, los métodos más utilizados son los químicos, puesto que son simples, rápidos y permiten controlar el tamaño, la composición y la forma de las nanopartículas obtenidas. A continuación se explican brevemente los métodos químicos más relevantes. (21,22)

### - **Coprecipitación**

Es una de las técnicas más simples y eficientes, mediante la que se obtienen nanopartículas de 30 - 100 nm de tamaño. (22)

Consiste en la precipitación simultánea de soluciones salinas acuosas de  $Fe_{2+}$  y  $Fe_{3+}$  mediante la adición de una base como hidróxido de sodio o hidróxido de amonio. (18,21)

Determinados factores del proceso influyen en el tamaño y forma de las partículas sintetizadas. Entre los factores más importantes destacan: la relación  $Fe_{2+} / Fe_{3+}$ , temperatura, pH, tipo de sal empleada y tipo de base. (21)

### - **Descomposición térmica**

Es una técnica que se emplea para preparar IONP con un alto control de tamaño (4-16 nm) y forma de partículas. (18)

Consiste en descomponer precursores de organohierro en disolventes orgánicos de altos puntos de ebullición en presencia de tensioactivos estabilizantes. (21)

### - **Microemulsión**

Esta técnica permite obtener partículas de 4-15 nm de tamaño con forma cúbica o esférica.

Consiste en formar una microemulsión, un sistema compuesto por una fase acuosa con precursores de sal de hierro y otra oleosa, empleando tensioactivos para conseguir su estabilización. A esa microemulsión se le agrega un agente precipitante como amoníaco y las nanopartículas empezarán a precipitar. (18)

### - **Método sol-gel**

La técnica sol-gel constituye una herramienta de síntesis adecuada y sencilla para generar nanopartículas monodispersas, de tamaños relativamente grandes y con buen rendimiento.

Dicha técnica se basa en procesos de hidrólisis y condensación de alcóxidos metálicos o precursores de alcóxido, que forman dispersiones de partículas de óxido de hierro en sol, que posteriormente se gelifica o seca por reacción química o eliminación de disolvente, generando una red de óxido de hierro tridimensional.

Ciertos parámetros como la velocidad de reacción, temperatura, naturaleza de los precursores, disolvente empleado y pH pueden influir en la obtención de diferentes estructuras y tamaños de nanopartículas. (18,21)

## **2 OBJETIVOS**

En este trabajo, se pretende estudiar la influencia de la aplicación de IONP en procesos de regeneración ósea, y así determinar si dichas nanopartículas intervienen en la diferenciación celular de células madre a células del linaje osteoblástico, produciendo una más eficaz y rápida regeneración ósea.

## **3 MATERIAL Y MÉTODOS**

La metodología empleada para la realización del trabajo ha consistido en una búsqueda bibliográfica de diversos artículos científicos, empleando herramientas como Google Academics, Scielo, Sciencedirect y Pubmed.

Las palabras claves utilizadas son: mecanotransducción, nanopartículas de óxido de hierro, aplicaciones, síntesis, regeneración ósea y andamios.

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Este trabajo se centra en las IONP y sus posibles aplicaciones, destacando principalmente su papel en la mejora de procesos de regeneración ósea. Para demostrar su influencia, me he basado en dos estudios en los que se aplican IONP en procesos de regeneración ósea.

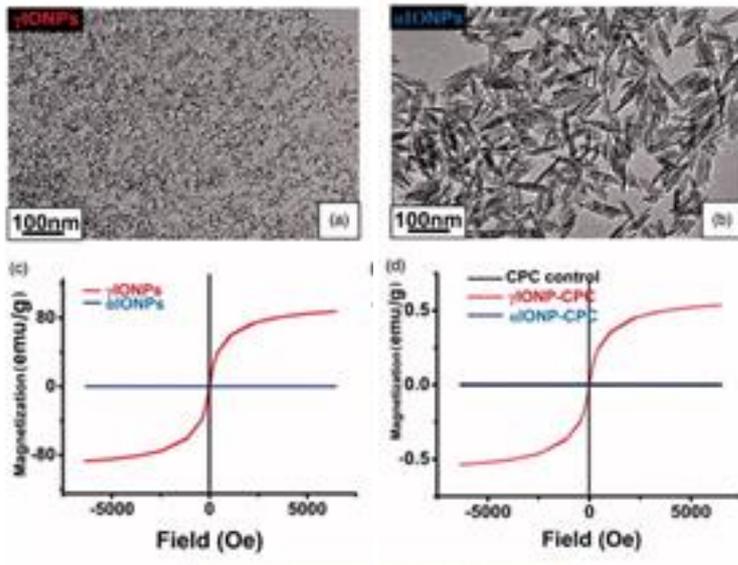
Un **primer estudio** consistió en desarrollar un andamio de cemento de fosfato de calcio (CPC) que contenga IONP, concretamente hematita ( $\alpha$ IONP) y maghemita ( $\gamma$ IONP). Con el fin de investigar si la diferenciación osteogénica de hDPSC sembradas en dicho cemento (IONP-CPC), prosperaba para producir una mejor regeneración ósea. (23)

Para demostrarlo, se estudió si la adición de IONP desarrollaría las propiedades del CPC para mejorar el proceso de regeneración ósea, si las IONP influirían en una mayor expresión de genes osteogénicos y de síntesis de proteínas de ALP de las hDPSC y si las IONP contribuirían a una mayor síntesis de mineralización ósea por las células madre.

## Resultados del primer estudio:

### - Caracterización de IONP y IONP-CPC

Se realizó TEM que mostró que  $\gamma$ IONP presenta forma esférica y un diámetro de partícula de 7-8 nm (fig 1a). Mientras que  $\alpha$ IONP posee forma de huso con un tamaño de 10x90 nm (fig 1b). Ambos presentaban un índice de polidispersibilidad (PDI) bajo, que indicaba distribuciones de tamaño con pocas variaciones. Las propiedades magnéticas se evaluaron mediante la curva de magnetización de las muestras, según las variaciones del campo magnético (fig 1c).  $\gamma$ IONP presentó comportamiento magnético típico, confirmando sus propiedades superparamagnéticas. El andamio que contenía  $\gamma$ IONP permitió su atracción por un imán (fig 1e). Por su parte,  $\alpha$ IONP no reflejó comportamiento magnético, de modo que el andamio con  $\alpha$ IONP y el control (CPC) no fueron atraídos. También se confirmaron estos resultados mediante pruebas con magnetómetro de muestra vibrante [VSM] (fig 1d). (23)



Figuras 1a y 1c

Figuras 1b y 1d

**Figs. 1** Fabricación IONP-CPC.

**Fig. 1a** TEM de  $\gamma$ IONP.

**Fig. 1b** TEM de  $\alpha$ IONP.

**Fig. 1c** Bucles de histéresis magnética de  $\gamma$ IONP y  $\alpha$ IONP.

**Fig. 1d** Bucles de histéresis magnética de superposición de VSM.

**Fig. 1e** Atracción por imán de CPC,  $\gamma$ IONP-CPC y  $\alpha$ IONP-CPC.



Figura 1e

(23)

Se evaluó por SEM la morfología de la superficie de los andamios. Las partículas del CPC consistían en pequeños cristales y numerosos poros. Los dos IONP-CPC presentaban más microporos que el control, y a su vez  $\gamma$ IONP-CPC poseía más poros que  $\alpha$ IONP-CPC. Se realizó espectrometría de rayos X de dispersión de energía (EDS) que detectó contenido de hierro en  $\gamma$ IONP-CPC pero no en  $\alpha$ IONP-CPC, espectroscopía de absorción atómica (AAS)

obteniendo un contenido de hierro del 1% en  $\gamma$ IONP-CPC y del 0,05% en  $\alpha$ IONP-CPC. Además se detectaron picos de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  no muy agudos en  $\gamma$ IONP-CPC mediante XRD y se detectó aún menos hierro en  $\alpha$ IONP-CPC, concordando con los anteriores resultados.

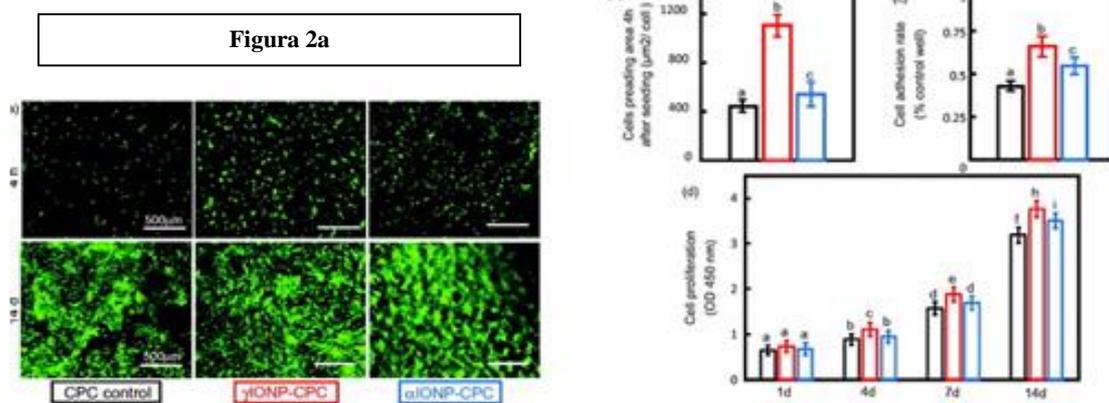
#### - **Propiedades biológicas de IONP-CPC**

A las 4 horas se examinó, empleando microscopía de fluorescencia, la adhesión y propagación de hDPSC (fig 2a). Las células del control CPC reflejaron una propagación limitada, mientras que las que contenían IONP indicaban una mayor propagación, principalmente las de  $\gamma$ IONP. También, a partir de imágenes de fluorescencia, se determinó una mejora significativa del área de propagación celular cuantificada entre el control (CPC) y los IONP-CPC (fig 2 b). Destacando la gran diferencia entre los datos del  $\gamma$ IONP-CPC respecto al CPC. Se calculó la proporción de células adheridas mediante el control de pocillos de cultivo, obteniendo que más células se adhirieron al  $\gamma$ IONP-CPC ( $p < 0,01$ ) y a  $\alpha$ IONP-CPC ( $p < 0,05$ ) que al CPC (fig 2c). La propagación fue mayor en  $\gamma$ IONP-CPC que en  $\alpha$ IONP-CPC como muestran los valores. Además se valoró la proliferación celular de hDPSC en el armazón usando un kit de recuento de células [CCK-8] (fig 2d). Se obtuvieron resultados que indican diferencias significativas entre  $\gamma$ IONP-CPC y el CPC a partir del día 4 ( $p < 0,05$ ) e incluso más, en el día 14 ( $p < 0,01$ ).  $\alpha$ IONP no presentó diferencias respecto a CPC hasta el día 14 ( $p < 0,05$ ).

Se comprobó la viabilidad celular a los 14 días, mediante tinción con calceína AM que daba una coloración verde (fig 2a). No se obtuvieron resultados significativos de muerte celular, fueron consecuentes con los resultados cuantitativos de CCK-8 y reflejaron que las células en  $\gamma$ IONP-CPC eran más numerosas y gruesas que en el andamio control (CPC).

**Figura 2.** IONP-CPC promovió la adhesión, propagación y proliferación de hDPSC. (23) **2a** Células vivas teñidas con Calceína AM (verde) a las 4 h y 14 días tras la siembra. **2b** Área de expansión celular en el andamio. **2c** Relación de adhesión celular normalizada mediante control de pozos de cultivo. **2d** Proliferación celular en el armazón por CCK-8. En cada gráfico, las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

Figuras 2b, 2c y 2d (23)



Por otro lado, se valoró la actividad de ALP a los 4, 7 y 14 días (fig 3). Todos los andamios experimentaron un incremento de actividad de ALP a medida que avanzaban los días. Los dos IONP-CPC percibieron un aumento similar del día 4 al 7, mayor respecto al CPC control ( $p < 0,05$ ). Del día 7 al 14 el incremento de los IONP-CPC respecto al control fue más significativo y hubo cierta diferencia entre el  $\gamma$ IONP-CPC que poseía una mayor actividad que la de  $\alpha$ IONP-CPC.

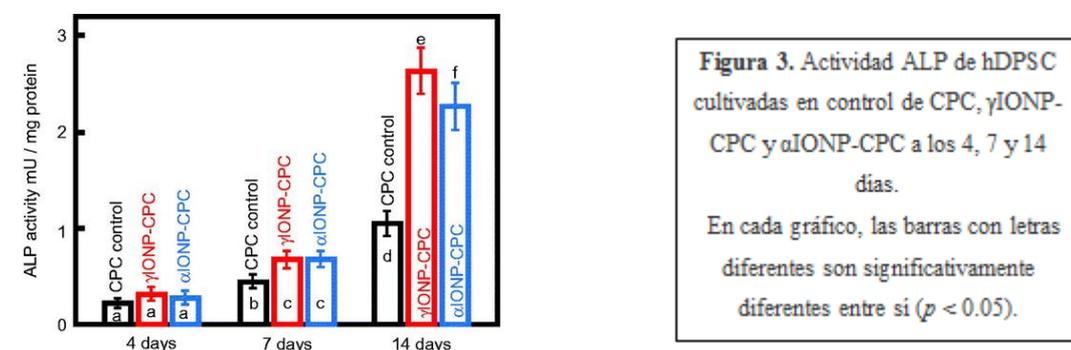


Figura 3 (23)

Se estudiaron ARNm específicos de osteoblastos incluyendo genes como ALP, COL1 $\alpha$ , RUNX2 y OCN a los 7 y 14 días (figs 4). Los datos obtenidos indicaron diferencias significativas entre los andamios con IONP y el control. A los 7 días las expresiones de ALP, COL1 $\alpha$ , RUNX2 fueron más altas en andamios con IONP ( $p < 0,01$ ) que en el control, mientras que los niveles de OCN no presentaron diferencias tan notables. A los 14 días los niveles de expresión de ALP, COL1 $\alpha$ , RUNX2 y OCN en andamios con IONP fueron más altos que en el control. Los niveles de OCN experimentaron un incremento notable entre el día 7 y el 14 en los IONP-CPC, mientras que COL1 $\alpha$  disminuyó sus niveles de expresión.

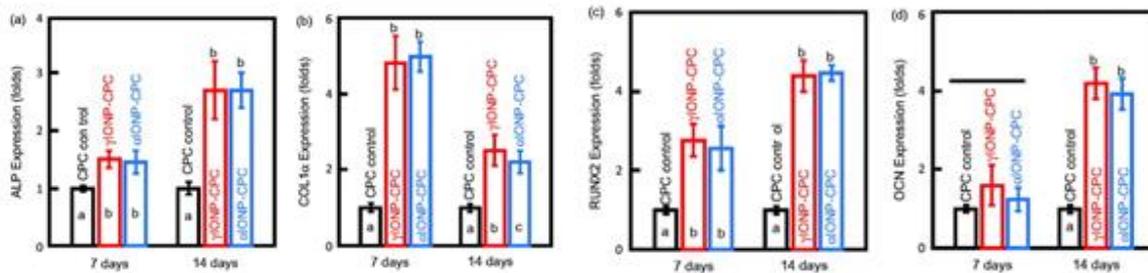


Figura 4a

Figura 4b

Figura 4c

Figura 4d

(23)

**Figura 4.** Los niveles de expresión de ARNm de genes osteogénicos en hDPSC a los 7 días y 14 días, con todos los datos relativos a hDPSC en el control de CPC. **4a** Niveles de expresión de *ALP*. **4b** Niveles de expresión de *COL1a*. **4c** Niveles de expresión de *RUNX2*. **4d** Niveles de expresión de *OCN*. En cada gráfico, las barras con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Se realizó tinción roja para medir síntesis de mineralización ósea por las hDPSC a los 7, 14 y 21 días (fig 5). Los resultados reflejaron que a los 7 días no había diferencias significativas en su síntesis ( $p > 0,05$ ). A los 14 días sí hubo diferencias significativas,  $\gamma$ IONP-CPC mostró más mineralización ( $p < 0,01$ ) respecto a CPC y  $\alpha$ IONP-CPC también mayor mineralización, pero en menor medida ( $p < 0,05$ ). A los 21 días las diferencias entre los andamios con IONP fueron más grandes respecto al control, siendo  $\gamma$ IONP-CPC el de mayor mineralización.

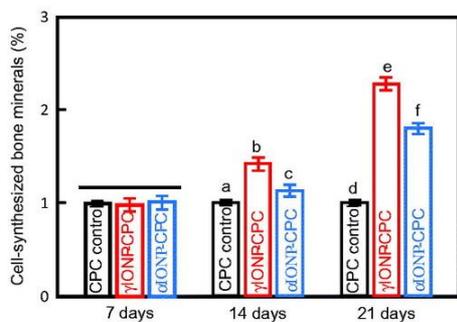


Figura 5

Figura 5. Síntesis de minerales de matriz ósea por hDPSC en los andamios.  
Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

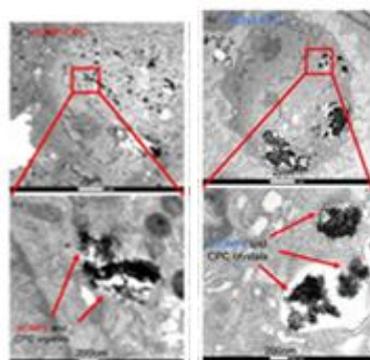
(23)

#### - Internalización de IONP en hDPSC

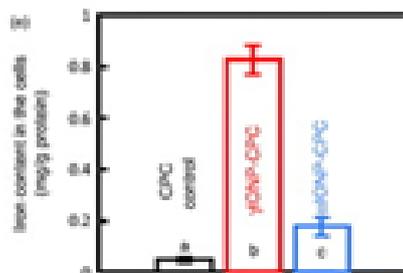
Se realizó TEM para comprobar la internalización de IONP en hDPSC. Las imágenes mostraron que agregados nanométricos fueron absorbidos por las hDPSC (figs 6). Además se hizo una medición cuantitativa del contenido de hierro en dichas células, empleando espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Se detectó

hierro en ambos andamios con IONP, pero hubo mayor internalización en la muestra de  $\gamma$ IONP-CPC que en la de  $\alpha$ IONP-CPC (fig 6e).

**Figura 6.** TEM de gran aumento dentro de las células, que muestran hDPSC con IONP endocíticos.



**Figuras 6a y 6c**      **Figuras 6b y 6d**



**Figura 6e**

Las células sembradas en  $\gamma$ IONP-CPC (6a y 6c) y en  $\alpha$ IONP-CPC (6b y 6d) contenían nanoagregados internalizados en las células. 6e Medición cuantitativa del contenido de hierro por ICP-OES. Datos = media  $\pm$  DE. Las barras indicadas por letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ).

(23)

#### - Efectos del magnetismo en la mejora de diferenciación celular

Para detectar si los efectos magnéticos de  $\gamma$ IONP-CPC cumplen un papel importante en la mejora de la regeneración ósea, se preparó un andamio desmagnetizado con nanopartículas de óxido de hierro ( $D\gamma$ IONP-CPC). Para desmagnetizarlo se sometió al  $\gamma$ IONP-CPC a un calentamiento de 120°C durante 8 horas. Los comportamientos de  $D\gamma$ IONP-CPC se examinaron de la misma forma que los  $\gamma$ IONP-CPC y se obtuvieron resultados semejantes. Se analizaron más pruebas que comprobaron si había cambios en la estructura y fases cristalinas como SEM y XRD. No se obtuvieron resultados que indicaran diferencias significativas, por lo que parece que el magnetismo no ejercía influencia significativa en este experimento sin campo magnético externo.

Además, se estudió la expresión génica de un magnetorreceptor ISCA-1, que es una proteína de ensamblaje de grupo de hierro-azufre 1. No hubo diferencias significativas entre los tres andamios, por lo que refuerza el planteamiento de que el magnetismo no influye demasiado en el comportamiento de las hDPSC.

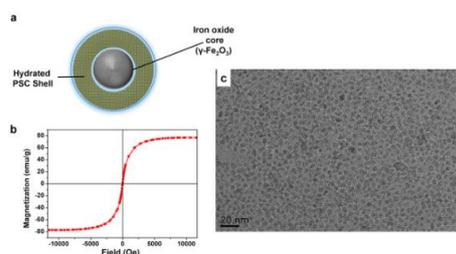
Un **segundo estudio** consistió en estudiar si el tratamiento con IONP promueve la diferenciación osteogénica de las hBMSC e intentar determinar que posibles vías pueden influir en dicha diferenciación osteogénica. (24)

## Resultados del segundo estudio:

### - Propiedades fisicoquímicas de las IONP

Se prepararon mediante coprecipitación una dispersión acuosa de IONP, las cuales estaban constituidas por un núcleo de  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  y una capa de poliglucosa - sorbitol-carboximetiléter [PSC] (fig 7a). El PSC se modificó con dextrano para proporcionar mayor estabilidad. Se obtuvo que las IONP presentaban menor probabilidad de lixiviación de hierro libre y de producir reacciones idiosincrásicas y alérgicas.

En la figura 7b se muestra el bucle de histéresis, lo que indica su comportamiento superparamagnético. También se realizó TEM que reflejó una distribución uniforme de las IONP y un tamaño medio de partícula de 7 nm (fig 7c).



Cuadro 1. Principales parámetros de los IONP sintetizados.

Muestra	Tamaño hidrodinámico (nm)	Índice de polidispersidad (PDI)	Magnetización por saturación (emu / g)	Constante de relajación $T_2$ ( $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
IONPs	$30,15 \pm 0,1843$	$0,158 \pm 0,016$	77	97,8

Figuras 7a, 7b y 7c

Figura 7. Preparados IONP. 7a Estructura esquemática de IONP. 7b Bucle de histéresis de IONP. 7c TEM de IONP. (24)

### - Internalización y biocompatibilidad de IONP

Mediante una espectrofotometría de fenantrolina se obtuvo la cuantificación de hierro en lisados celulares tras una coincubación de 24-72 horas (fig 8a). Se aprecia que el contenido de hierro absorbido por las hBMSC varía con el tiempo y la dosis. También se hizo una tinción azul de Perl (fig 8b) para valorar la internalización, al igual que en el anterior método, se reflejó que a mayor dosis y tiempo más internalización se producía. Al realizar la tinción, se produjo un cambio de morfología de las hBMSC tratadas con IONP a concentraciones de 100 y 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  que podría significar diferenciación temprana de dichas células. Para evaluar la biocompatibilidad, tratamos las células con diferentes concentraciones de IONP durante 4, 12 y 24 horas y luego se procesaron para incubarlas con CCK-8 (fig 8c). Las células presentaban una viabilidad de más del 85% en todas las dosis y tiempos, tras 24 horas las células tratadas a concentraciones de 100 y 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  disminuyeron su viabilidad en un 6,12% y 8,64% respectivamente.

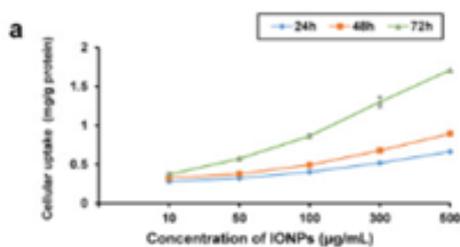


Figura 8 a

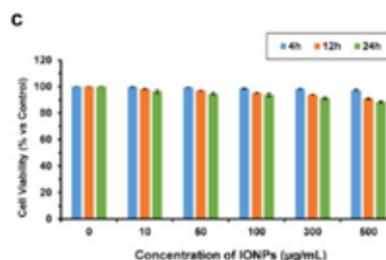


Figura 8 c

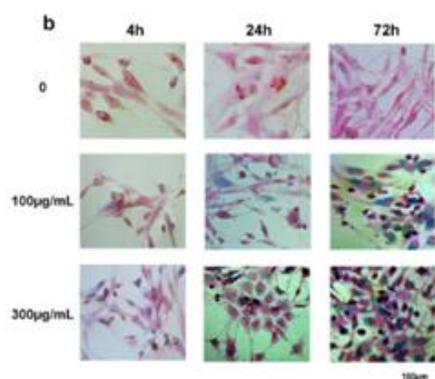


Figura 8 b

**Figura 8. Internalización y citotoxicidad de IONP.**  
**8a** Contenido de hierro intracelular después del tratamiento con IONP para diferentes concentraciones y tiempo.  
**8b** Tinción azul de Perl de hBMSC tratadas con IONP.  
 Barra de escala: 100 µm.  
**8c** Viabilidad celular detectada por ensayo CCK-8 a las 4, 12 y 24 horas después de tratar con diferentes concentraciones de IONP. Las barras representan la media ± DE.

(24)

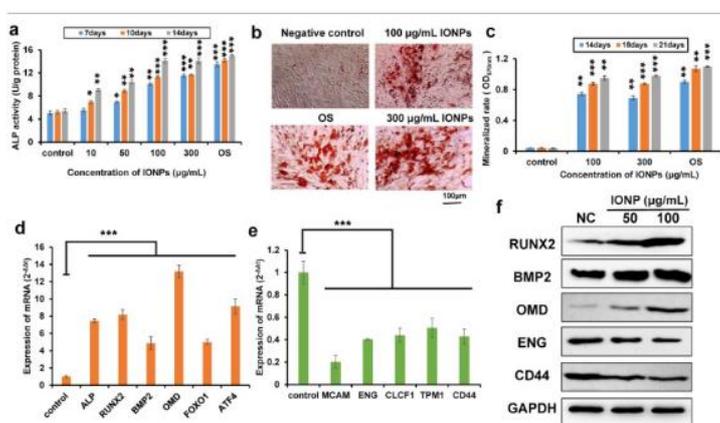
#### - Promoción de la osteogénesis por IONP en tratamiento in vitro

Se estudió la actividad de ALP a los 7, 10 y 14 días a diferentes concentraciones de IONP y con OS (fig 9a). Los datos de actividad de ALP indican que las células tratadas con IONP la incrementan, de 10 a 100 µg/ml presentan aumento en función de la dosis. La dosis de 300 µg/ml no supone una gran diferencia respecto a la de 100 µg/ml, por lo que podría indicar que es la más adecuada. El tiempo también influye, la actividad de ALP aumentó significativamente a los 14 días y se aprecian niveles parecidos entre las células tratadas con dosis altas de IONP respecto de las tratadas con OS.

Se realizó tinción con rojo de alizarina S (ARS) para detectar nódulos mineralizados. Los resultados mostraron mayor mineralización en las células tratadas con IONP, se formaron nódulos masivos mineralizados y se tiñeron de rojo las hBMSC tratadas con IONP a concentraciones de 100 y 300 µg/ml (fig 9b). En la figura 9c se cuantificó que nódulos mineralizados crecieron en torno a 20% entre los días 14 y 21. De modo que es posible, que la transformación de hBMSC en osteoblastos maduros se completara en el día 21.

Se analizaron distintos marcadores osteogénicos: ALPL (hígado ALP), RUNX2 o CBFA1, BMP2, OMD (osteomodulina), FOXO1 (caja de horquilla O1) y ATF4 (factor de transcripción de activación 4) a través del experimento Q-PCR (fig 9d). Se obtuvo como resultado una expresión de ARNm de estos marcadores incrementada 4-12 veces bajo la

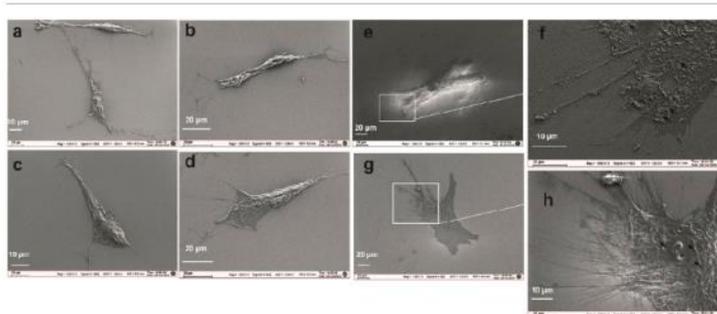
influencia de IONP. También se hizo un ensayo de transferencia Western para detectar el nivel de expresión de proteínas RUNX2, BMP2 y OMD. Se manifestó una influencia positiva de expresión bajo la influencia de IONP en concentraciones de 50 ó 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (fig 9f). Posteriormente, se detectaron marcadores pertenecientes a hBMSC que incluían moléculas de adhesión de células de melanoma (MCAM), endoglina (ENG), factor de citosina similar a cardiotrofina 1 (CLCF1), tropomiosina 1 (TPM1) y CD44 (fig 9e). La expresión de ARNm de estos genes se redujo 2,5-5 veces y el nivel de proteína de ENG y CD44 también se redujo. Por tanto, es probable que los resultados anteriores signifiquen que se haya producido una diferenciación de hBMSC a osteoblastos.



Figuras 9: 9a, 9b, 9c, 9d, 9e y 9f. (24)

**Figura 9.** Evaluación de la diferenciación osteogénica. **9a** Actividad ALP de las hBMSC. **9b** Rojo de alizarina S de hBMSC durante 21 días. **9c** Mineralización cuantificada por elucución de ARS de la matriz ósea mineral teñida. **9d** / **9e** Expresión de ARNm detectados por Q-PCR después de exposición a IONP de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 7 días. **9f** Expresión del nivel de proteína detectado por transferencia Western después de exposición a IONP de 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 7 días. Las barras representan la media  $\pm$  DE.

Mediante SEM se analizó la morfología de las hBSMC (figs 10). En las imágenes (a-d) se muestran hBSMC cultivadas sin IONP con una morfología delgada. En hBSMC cultivadas con OS (e-f) y en las tratadas (100  $\mu\text{g}$ ) con IONP (g-h), la forma de las células era poligonal, con filopodios más organizados y la matriz depositada en superficie tenía mayor resolución.



Figuras 10: 10a, 10b, 10c, 10d, 10e, 10f, 10g y 10 h. (24)

- **Respuesta de la vía de la señal de MAPK en hBMSC tratadas con IONP**

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) es una base de datos para extraer rutas moleculares relacionados con experimentos. En este caso, se empleó para identificar posibles rutas relacionadas y así explicar, mecanismos moleculares por los que las IONP promueven la osteogénesis. Se obtuvo como resultado que 3 vías se vieron influidas positivamente ( $p < 0,05$ ) y la vía de señalización MAPK se centró en el control de la diferenciación celular mediante la regulación de genes. Se encontraron 33 genes regulados positivamente y 22 negativamente, distribuidos en casi todas las cascadas de la vía. Ejemplos de genes alterados: receptores tirosina quinasas (RTK) como FGFR, PDGFR; Ras, MAPKKK como Tpl2/Cot (o también MAP3K8), MAPKK como MEK2 (o denominado MAP2K2) y otras quinasas como p90RSK. Además, se realizó un análisis cuantitativo de los genes implicados en la vía clásica de MAPK, incluyendo receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1), homólogo del oncogen viral del sarcoma (KRAS), MAP3K8, MAP2K2, proteína quinasa S6 ribosómica, 90 kDa, polipéptido 1 (RPS6KA1) y RPS6KA3 (fig 11).

Obtuvimos como resultado nivel de ARNm de FGFR1, KRAS, RPS6KA1 y RPS6KA3 de expresión elevados entre 4 y 11 pliegues. Mientras que, MAP2K2 presentó una regulación negativa en comparación con el control. Por tanto, los resultados sugieren que la vía MAPK clásica se ve influida por el tratamiento con IONP.

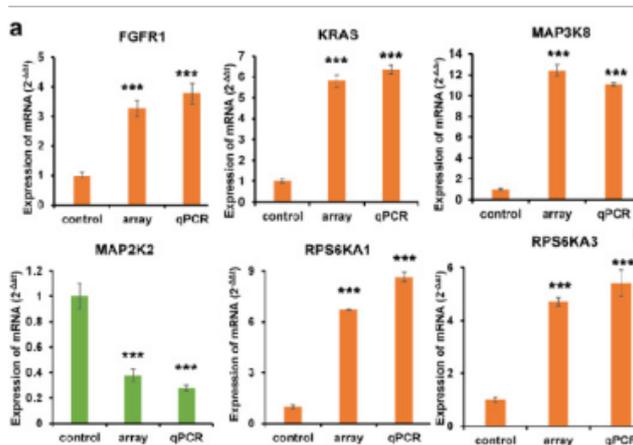


Figura 11. Detección de genes implicados en la ruta de la señal MAPK clásica. Expresión de ARNm detectados por Q-PCR después de una exposición de 100 µg / ml de IONP durante 7 días. Las barras representan la media ± DE.

Figura 11

(24)

## 5 CONCLUSIÓN

La investigación científica en relación a las nanopartículas está en continuo desarrollo. Las IONP presentan múltiples aplicaciones potenciales, en este trabajo se ha focalizado en su capacidad para la reparación de tejidos óseos. Los resultados de los estudios reflejan que las IONP mejoran los procesos de regeneración ósea. Los mecanismos que facilitan la regeneración ósea no se conocen de forma exacta, pero se cree que contribuyen a la diferenciación osteogénica e intervienen en la regulación de vías de señalización. En resumen, las IONP constituyen una línea de investigación muy interesante con numerosos interrogantes a resolver.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

1. Mechanotransduction gone awry | Nature Reviews Molecular Cell Biology [Internet]. [citado 19 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrm2597>
2. Orr AW, Helmke BP, Blackman BR, Schwartz MA. Mechanisms of Mechanotransduction. Dev Cell. 1 de enero de 2006;10(1):11-20.
3. Huang C, Ogawa R. Mechanotransduction in bone repair and regeneration. FASEB J. 2010;24(10):3625-32.
4. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. Biomaterials. 1 de octubre de 2001;22(19):2581-93.
5. Regeneracion-osea-Biomateriales-sustitutos-oseos-y-sustitutos-del-injerto-oseo.pdf [Internet]. [citado 19 de agosto de 2020]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Jose\\_Sueiro-Fernandez/publication/309728145\\_Regeneracion\\_osea\\_Biomateriales\\_sustitutos\\_oseos\\_y\\_sustitutos\\_del\\_injerto\\_oseo/links/5822002108ae538586a015a5/Regeneracion-osea-Biomateriales-sustitutos-oseos-y-sustitutos-del-injerto-oseo.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jose_Sueiro-Fernandez/publication/309728145_Regeneracion_osea_Biomateriales_sustitutos_oseos_y_sustitutos_del_injerto_oseo/links/5822002108ae538586a015a5/Regeneracion-osea-Biomateriales-sustitutos-oseos-y-sustitutos-del-injerto-oseo.pdf)
6. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, Canto Pingarrón M del, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal Internet. febrero de 2006;11(1):47-51.
7. 91026363003.pdf [Internet]. [citado 19 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/910/91026363003.pdf>
8. 179214945008.pdf [Internet]. [citado 19 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1792/179214945008.pdf>
9. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, Canto Pingarrón M del, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II: El proceso de remodelado. Med Oral Patol Oral Cir Bucal Internet. abril de 2006;11(2):151-7.

10. divulgacion\_5cd0aa9319d46.pdf [Internet]. [citado 19 de agosto de 2020]. Disponible en: [https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion\\_5cd0aa9319d46.pdf#page=60](https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5cd0aa9319d46.pdf#page=60)
11. Evia JRB. Marcadores de remodelado óseo y osteoporosis. 2011;58:25.
12. Barreto JFA. Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. 2009;1:13.
13. Alfaro JJB, Fernández JS, Pesudo RG, Bermúdez JFD, Lanau JV. REGENERACIÓN ÓSEA. BIOMATERIALES, SUSTITUTOS ÓSEOS Y SUSTITUTOS DEL INJERTO ÓSEO. :17.
14. Estrada C, Paz AC, López LE. INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO: CONSIDERACIONES BÁSICAS. Rev EIA. junio de 2006;(5):93-100.
15. Suarez D. PRINCIPIOS BÁSICOS EN REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA. 14 de marzo de 2012;2:89-116.
16. García Carvajal ZY, Espinosa-Andrews H. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Mundo Nano Rev Interdiscip En Nanociencia Nanotecnología. 3 de enero de 2017;9(17):117.
17. Velasco Peña MA, Garzón Alvarado DA. Implantes Scaffolds para regeneración ósea.: Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión. Rev Cuba Investig Bioméd. marzo de 2010;29(1):0-0.
18. Campos EA, Pinto DVBS, Oliveira JIS de, Mattos E da C, Dutra R de CL, Campos EA, et al. Synthesis, Characterization and Applications of Iron Oxide Nanoparticles - a Short Review. J Aerosp Technol Manag. septiembre de 2015;7(3):267-76.
19. Gregorio-Jáuregui KM, Rivera-Salinas JE, Saade H, López-Campos RG, Martínez-Hernández JL, Iliina A. C.4 Las nanopartículas magnéticas y sus múltiples aplicaciones. :15.
20. nce.pdf [Internet]. [citado 22 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/3191/nce.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
21. Dadfar SM, Roemhild K, Drude NI, von Stillfried S, Knüchel R, Kiessling F, et al. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. Adv Drug Deliv Rev. 1 de enero de 2019;138:302-25.
22. Ali A, Zafar H, Zia M, ul Haq I, Phull AR, Ali JS, et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. Nanotechnol Sci Appl. 19 de agosto de 2016;9:49-67.
23. Xia Y, Chen H, Zhang F, Wang L, Chen B, Reynolds MA, et al. Injectable calcium phosphate scaffold with iron oxide nanoparticles to enhance osteogenesis via dental pulp stem cells. Artif Cells Nanomedicine Biotechnol. 31 de octubre de 2018;46(sup1):423-33.
24. Wang Q, Chen B, Cao M, Sun J, Wu H, Zhao P, et al. Response of MAPK pathway to iron oxide nanoparticles in vitro treatment promotes osteogenic differentiation of hBMSCs. Biomaterials. 1 de abril de 2016;86:11-20.