

INTRODUCCIÓN

Los crecientes requisitos de las terapias de regeneración ósea para remediar el trauma, enfermedades degenerativas, rechazo inmunológico, impulsado por un envejecimiento demográfico y agravado por un entorno económico austero representa un desafío para la ortopedia. La hidroxiapatita (HA) formada por cristales de calcio y fosfato, constituye un 70% de la masa ósea de los vertebrados y presenta buenas propiedades como biomaterial al ser biocompatible, bioactiva, osteoconductiva y se une directamente al hueso. Al añadir Plata con reportes de actividad osteogénica y como componente antimicrobiano 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. Altas concentraciones de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-6 son potentes inductores de la reabsorción ósea. El IMMUNEPOTENT-CRP es un extracto dializable de leucocitos de bazo bovino que ha demostrado efectos inmunomoduladores, antiinflamatorios y antioxidantes. Este trabajo tiene el objetivo de desarrollar y caracterizar nanocompositos para la regeneración ósea a base de hidroxiapatita (HA) y nanopartículas de plata (NPs Ag) en combinación con IMMUNEPOTENT-CRP (ICRP) un extracto dializable leucocitario bovino como un modulador del sistema inmune para favorecer la actividad de osteoblastos.

HIPÓTESIS

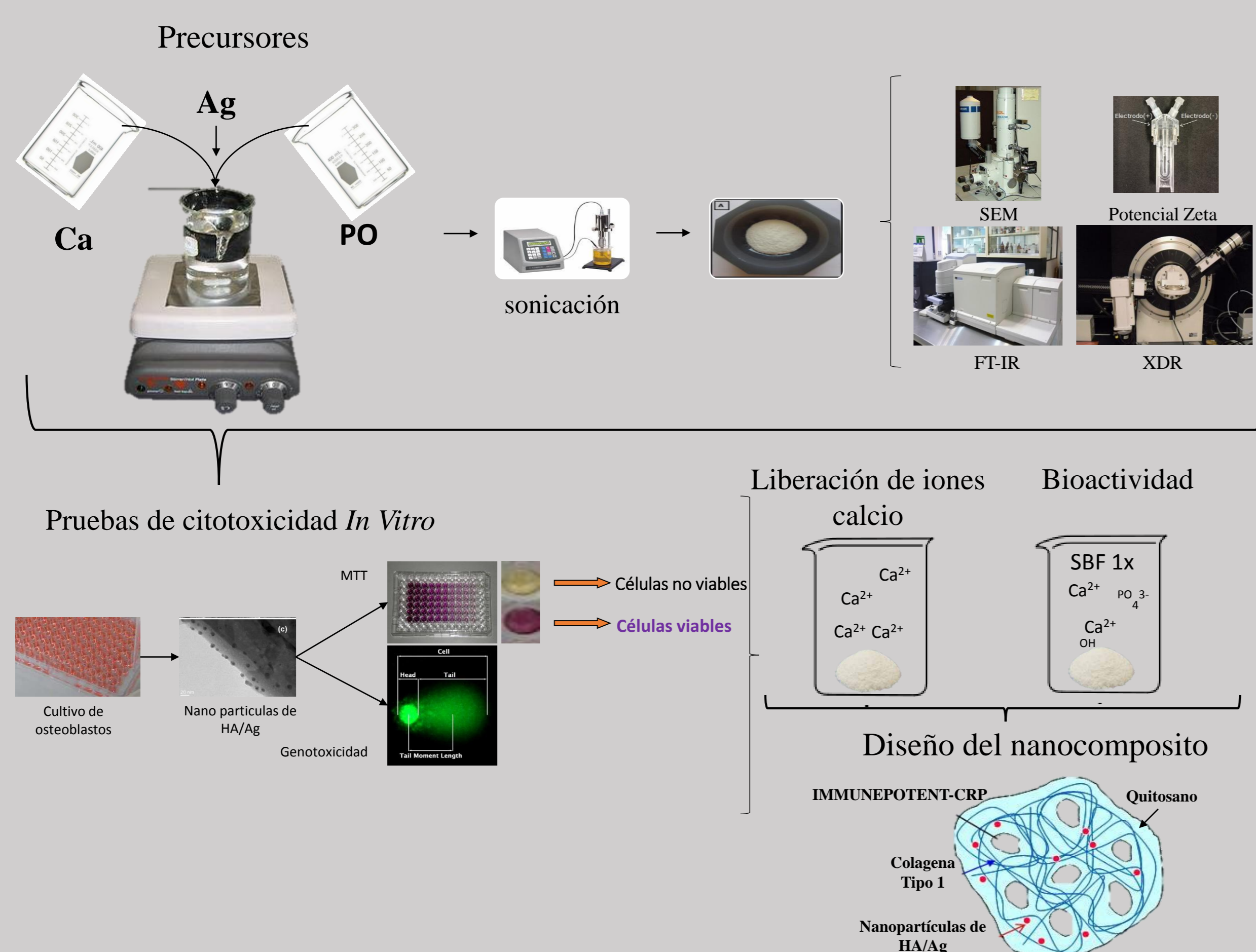
Los sustitutos óseos a base de hidroxiapatita, nanopartículas de plata e IMMUNEPOTENT-CRP favorece la regeneración ósea.

OBJETIVO

Desarrollar y caracterizar compósitos cargados con hidroxiapatita, nanopartículas de plata e IMMUNEPOTENT-CRP y evaluar su capacidad de regeneración ósea en un modelo *in vivo*.

- 1.- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de hidroxiapatita/plata.
- 2.- Evaluar la actividad citotóxica y genotóxica de las nanopartículas de hidroxiapatita/plata
- 3.- Evaluar la bioactividad *in vitro* de los materiales en fluido corporal simulado
- 4.- Determinar la velocidad de liberación de Ca^{2+} en el nanocomposito por el método O-Cresolphthalein Complexone

METODOLOGÍA



RESULTADOS

En la figura 1 se muestra la morfología y tamaño de los polvos de fosfatos de calcio con NPs de Ag. Las partículas de hidroxiapatita se observan en formas irregulares con tamaños promedio de 1 μ m. Sobre su superficies se encuentran adheridas nanopartículas de plata de forma esféricas con tamaños de 20 nm (Fig 1a).

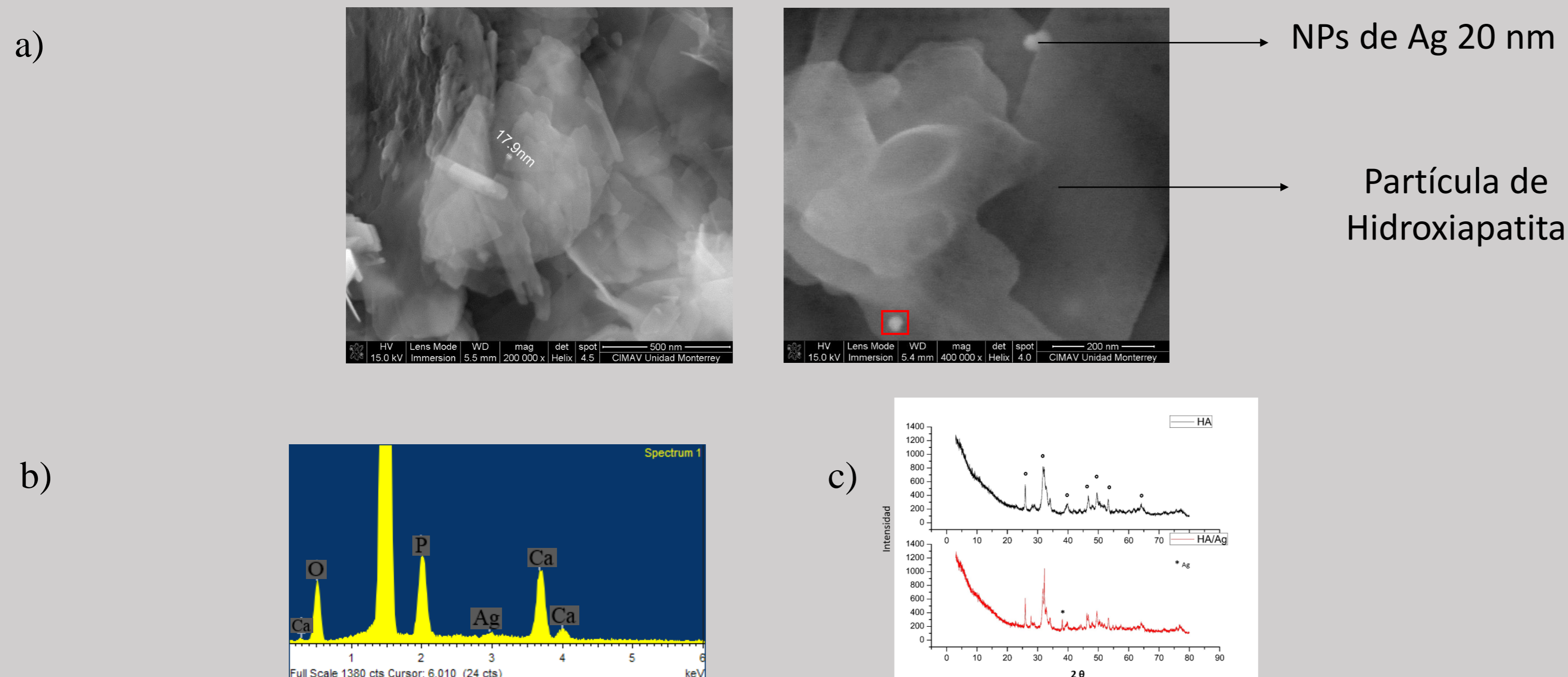


Figura 1.- Caracterización de polvos de Hidroxiapatita/plata. A) Microscopía Electrónica de Barrido b) Espectroscopia de Energía Dispersa (EDS) c) Difracción de rayos X.

El análisis de EDS resulta en picos de máxima intensidad que corresponden a los elementos de Ca, O, P y Ag. (Fig. 1b). La figura 1c muestra los patrones de DRX, el difractograma presenta los máximos de intensidad a 2θ 25.87, 31.7 característicos de la formación de hidroxiapatita (Fig. 1c).

Para evaluar la actividad citotóxica se partió de concentraciones de 1mg-0.1 μ g/ml de las partículas de HA con NPs de Ag con un tiempo de incubación de 24 horas sobre un cultivo primario de células óseas, Osteosarcoma humano (MG-63) y preosteoblastos de ratón (MC3T3-E1). Las NPs mostraron un efecto citotóxico sobre las células a concentraciones mayores de 100 μ g/ml, manteniendo una viabilidad del 100% a concentraciones inferiores de 10 μ g/ml. las partículas de HA fueron menos tóxicas respecto a las partículas de HA con NPs de Ag.

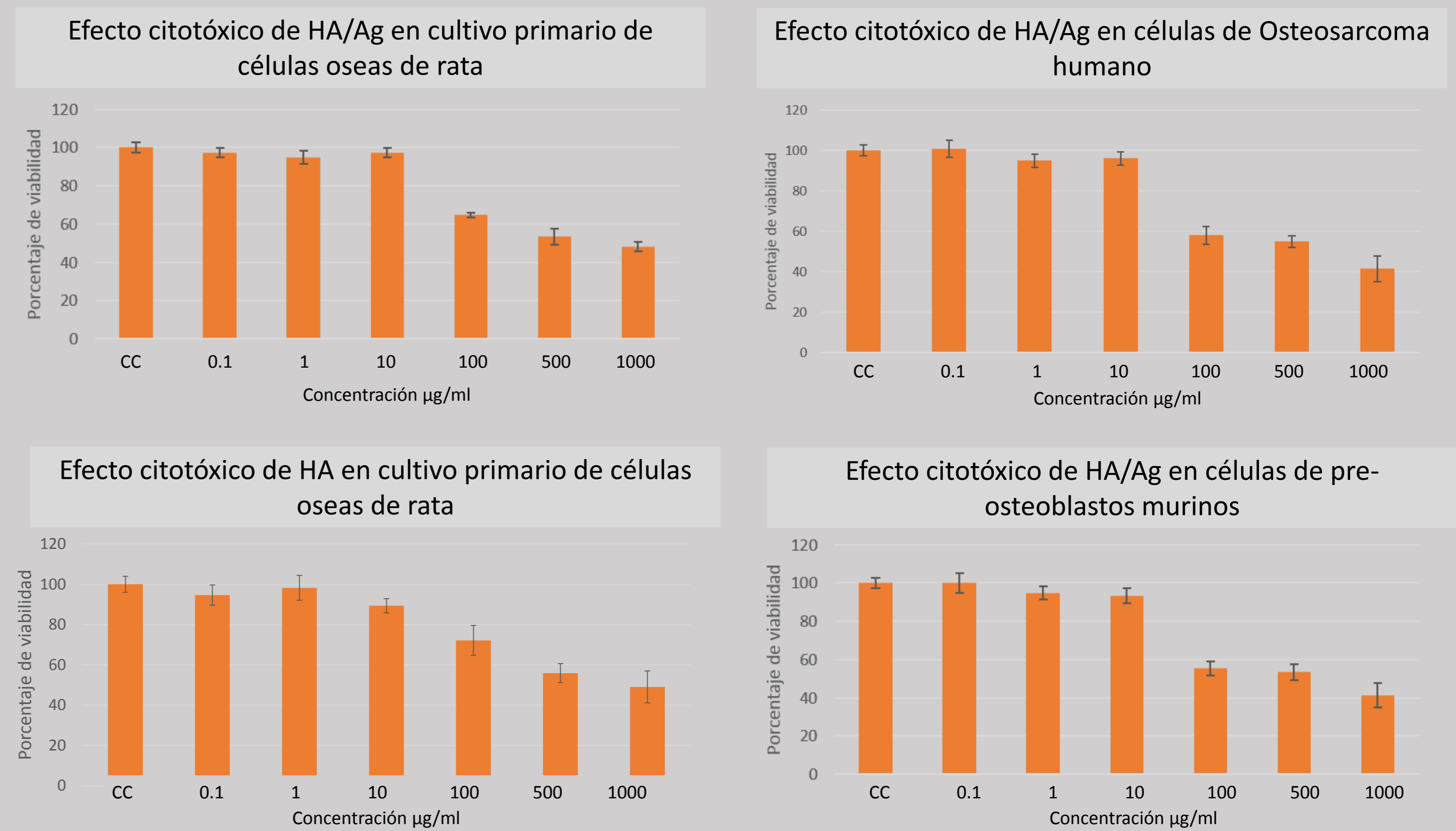


Figura 2.-Actividad citotóxica de partículas de HA/ con Nps de Ag por el método de viabilidad MTT.

Como un posible biomaterial para la regeneración de tejido óseo, se realizaron pruebas de bioactividad evaluando el proceso de mineralización mediante experimentos *in vitro* con fluido corporal simulado (SBF), para ello se incubó la muestra de HA/Ag en SBF 1X hasta 21 días. Al día 14 (Fig. 3a) se muestra el crecimiento de cristales con forma de placa características con la formación de apatita, así como al día 21 (Fig. 3b) se observaron estructuras de mayor tamaño que indican el crecimiento e integración las partículas de la muestra.

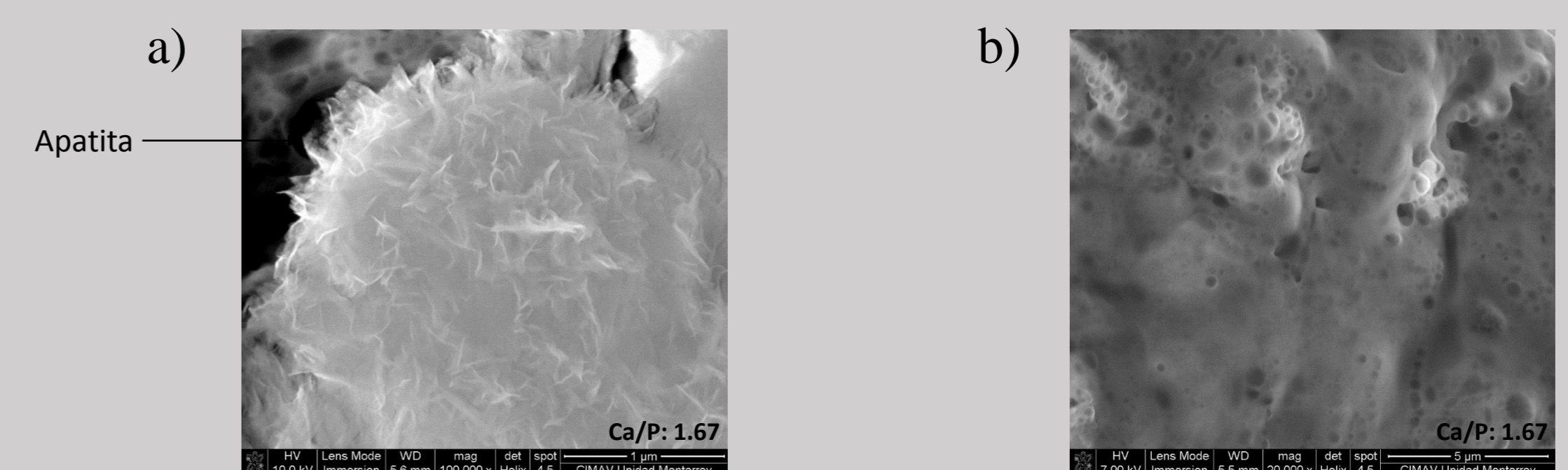


Figura 3.- Imágenes de microscopía electrónica de barrido, durante el proceso de mineralización. a) 14 días de incubación en SFB 1X. b) 21 días de incubación en SFB 1X.

El calcio es un inductor de la proliferación celular y diferenciación osteogénica, por lo que se evaluó la liberación de calcio al medio durante diferentes periodos de tiempo (Fig 4).

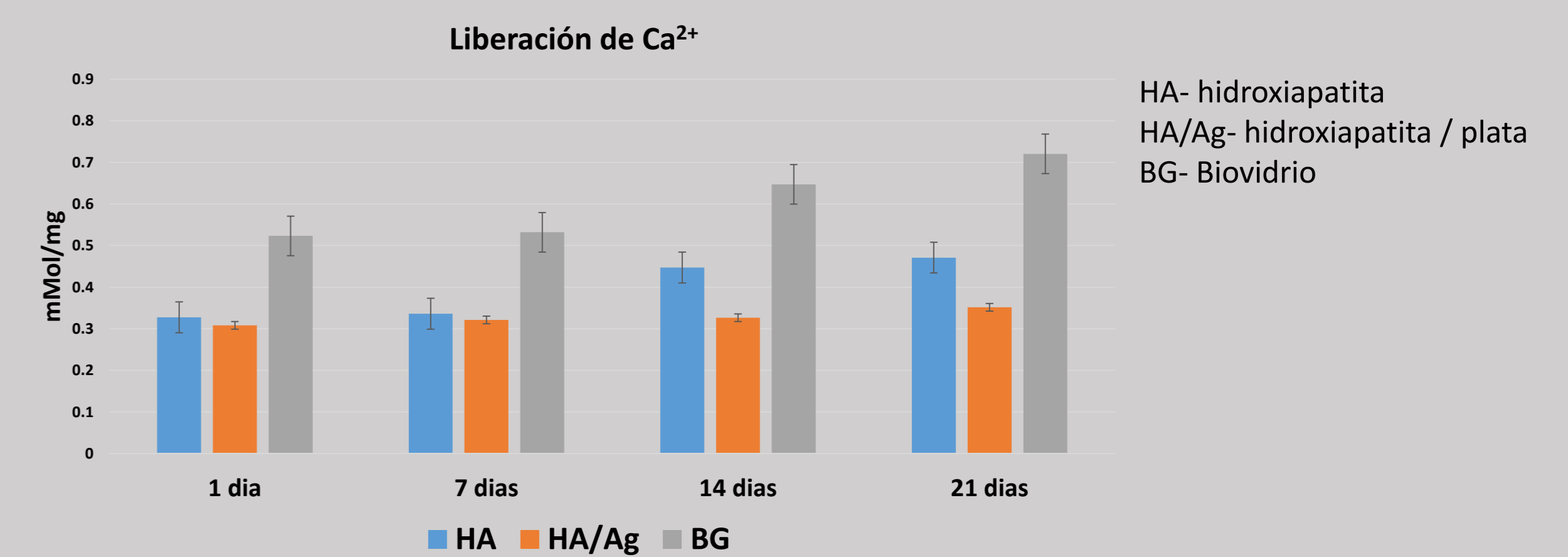


Figura 4.- Liberación de Ca^{2+} en solución de hank libre de calcio.

DISCUSIÓN

La de síntesis HA/Ag se basó en el método de precipitación ultrasónica descrito por *Jevtic et. al.* en 2008 con ciertas modificaciones, Las micrografías de SEM muestran nanopartículas esféricas de Ag adheridas a la superficie de HA, a través de esta reacción se obtiene Ag metálica como se reportó en la literatura y no influye en la composición de HA. Los tamaños de nanopartículas de Ag fueron en promedio de 20 nm, lo cual concuerda con los tamaños reportados por *Liu et. al.* 2013 y *Tian et. al.* 2016.

Los datos de DRX confirman la formación de depósitos de hidroxiapatita de acuerdo al patrón de difracción, similares a los reportados por *Arumugan et. al.* 2007. las partículas de HA/Ag muestra buenos resultados de bioactividad. *Lewandowska et.al.* Sugiere que la bioactividad *in vitro* es un índice del potencial bioactivo de materiales *in vivo*. Los iones de calcio en el medio liberados podría favorecer la osteoinducción mediante receptores celulares de Ca.

CONCLUSIÓN

La hidroxiapatita juega un papel importante en la medicina e implantología para la reconstrucción de tejidos óseos. En este trabajo se estandarizó un método de síntesis donde se cargó nanopartículas de plata sobre la superficie de partículas de HA con potencial actividad bioactiva y osteogénica.