

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN CON EL ADN
Y DE LAS PROPIEDADES PROINFLAMATORIAS DE
NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITAS MODIFICADAS

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Química
para optar al grado y título de Maestría Académica en Química

ERICKA ADRIANA FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

Dedicatoria

A mis padres por brindarme el apoyo, los recursos y la motivación para realizar este proyecto y a mis hermanos como muestra de perseverancia y esfuerzo.

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios por ser el promotor de todos mis sueños y metas, y darme la oportunidad de iniciar y concluir este proyecto.

A mi tutor el Dr. Alfonso García por su confianza, paciencia, por brindarme todos sus conocimientos y motivarme a concluir este proyecto.

A la Dra. Mavis Montero por toda la colaboración y apoyo brindado, no sólo a nivel académico, sino personal.

Al Dr. Victor Hugo Soto Tellini por su confianza y colaboración.

Al personal del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), por brindar su colaboración técnica y administrativa con gran disposición y generosidad, principalmente al Ing. Walter Hernández y el señor Ronald Hernández, por todos sus aportes a nivel técnico y profesional.

Al Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica, por el apoyo financiero brindado en este proyecto.

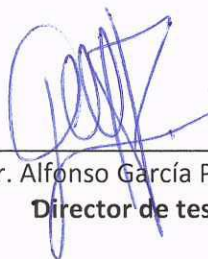
A mis compañeros de laboratorio, Francisco Venegas y Daniel Chacón, por compartir muchos días de trabajo juntos, creando siempre un ambiente de compañerismo, crecimiento y mucha ciencia. En especial, agradezco a Daniel por su paciencia y excelencia, al capacitarme y brindarme, desinteresadamente, todos sus conocimientos en microbiología.

Agradezco a Lisbeth Obando, Bruno Garita y a mis compañeros del Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA), por brindarme su motivación y apoyo.

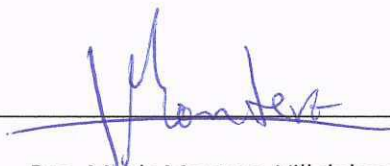
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Química de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Química.”



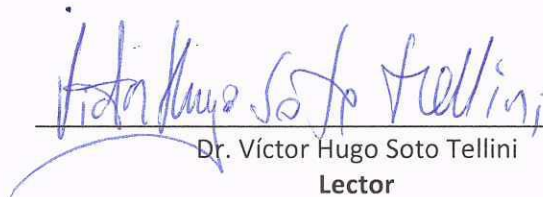
Dr. Erick Castellón Elizondo
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado



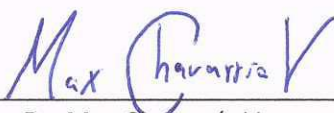
Dr. Alfonso García Piñeres
Director de tesis



Dra. Mavis Montero Villalobos
Lectora



Dr. Víctor Hugo Soto Tellini
Lector



Dr. Max Chavarría Vargas
Director Programa de Posgrado en Química



Ericka Adriana Fernández Fernández
Sustentante

Tabla de contenidos

	Número de página
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Hoja de aprobación	iv
Tabla de contenidos	v
Resumen	vi
Lista de cuadros	vii
Lista de figuras	viii
Lista de abreviaturas	x
Lista de apéndices	xii
Capítulo I. Introducción	1
- Biomateriales	1
- Generalidades de la hidroxiapatita	1
- Interacción de la hidroxiapatita con ácidos nucleicos	8
- Materiales de estudio	12
- Ensayos y técnicas de análisis	14
- Hipótesis	21
- Objetivo general	21
- Objetivos específicos	21
Capítulo II. Materiales y métodos	22
- Síntesis de hidroxiapatitas	22
- Funcionalización superficial de las hidroxiapatitas	22
- Preparación de las suspensiones de hidroxiapatita	23
- Espectroscopía infrarroja y potencial ζ	23
- Cultivos celulares	24
- Ensayos de citotoxicidad y actividad proinflamatoria	24
- Preparación de las suspensiones de ADN	26
- Isotermas de adsorción	26
- Ensayos de transfección celular	28
- Tratamiento estadístico de los datos	29
Capítulo III. Resultados y discusión de resultados	31
- Caracterización de las nanopartículas de hidroxiapatita en suspensión	31
- Citotoxicidad e inmunogenicidad de los materiales	37
- Adsorción de ADN sobre las hidroxiapatitas	39
- Eficiencia de las hidroxiapatitas como vector de transfección celular	46
Capítulo IV. Conclusiones	54
Bibliografía	56
Apéndices	65

Resumen

La hidroxiapatita (Hap) es un ortofosfato de calcio que constituye el principal componente mineral de los mamíferos y se encuentra presente en huesos, dientes, piel y tendones. Este compuesto ha sido utilizado ampliamente en la elaboración de prótesis e implantes ortopédicos, debido a que presenta propiedades como biocompatibilidad, bioresortividad, osteoconductividad, afinidad por biomoléculas y baja toxicidad, entre otras. Estas características le han conferido gran interés en su aplicación como vector génico, pues ha mostrado afinidad por proteínas de interés farmacológico y por el ADN de doble hebra y de hebra simple.

En la actualidad se comercian reactivos de transfección celular de fosfato de calcio basados en la precipitación "*in situ*" de los mismos, lo cual lleva a partículas de tamaño y morfología variable, que dificultan la repetibilidad de los resultados. El presente trabajo propone la evaluación de seis tipos de hidroxiapatita como posibles vectores de transfección, los cuales han sido sintetizados bajo un método de electrólisis que permite controlar la homogeneidad de la composición, morfología y tamaño de las nanopartículas. Dentro de los materiales se encuentran hidroxiapatitas no funcionalizadas con diferencias en su composición y funcionalizadas superficialmente con anhídrido succínico, succinimida o dihidrógenofosfato de 2-aminoetilo.

La biocompatibilidad de cada material fue determinada de manera cualitativa, mediante bioensayos de MTT con el linaje celular Raw 264.7, añadiendo diferentes cantidades conocidas de los material y utilizando espectrofotometría UV. De manera similar, se utilizaron bioensayos basados en la prueba de Griess para determinar la producción de óxido nítrico a diferentes cantidades del material, para identificar la presencia de actividades proinflamatorias. También, se determinaron sus propiedades fisicoquímicas tales como la afinidad y capacidad de adsorción del ADN mediante isoterma de adsorción de Langmuir, el tamaño de partícula en suspensión y su potencial ζ . Por último, se determinó la eficiencia de los materiales al ser utilizados como vectores de transfección celular, desarrollando ensayos que incluyeron técnicas como microscopía de fluorescencia y citometría de flujo.

De esta manera se determinó que los materiales no presentan una citotoxicidad significativa a las concentraciones utilizadas y que la viabilidad celular tiende a ser menor en presencia de las hidroxiapatitas funcionalizadas con succinato y anhídrido succínico, además, la prueba de Griess demostró que ninguno de los materiales presenta actividades proinflamatorias en las concentraciones estudiadas. Todos los materiales muestran valores de potencial ζ negativos en la suspensión de cloruro de sodio y se muestra que las funcionalizaciones superficiales tienden a disminuir este potencial. Además, no todos los materiales muestran un buen ajuste al modelo de Langmuir, lo cual puede estar relacionado con la baja reproducibilidad del método debido a la variabilidad del tamaño de partícula o a la existencia de eventos como la formación de capas múltiples de ADN o que se den diferentes tipos de interacciones entre el ADN y el material, debido a la heterogeneidad de la superficie del material.

Cabe destacar que Hap-amino es el material que menos se ajusta al modelo de Langmuir, en todo el rango de temperatura estudiado, mientras que la funcionalización con anhídrido succínico, muestra una tendencia de aumentar la capacidad de adsorción del material no funcionalizado, en todo el rango de temperatura de estudio y además, es la hidroxiapatita que presenta las mayores capacidades de adsorción máxima, entre la colección de materiales, siendo así el material con mejores resultados. Los valores negativos de energía libre de Gibbs muestran que el proceso de adsorción para todos los materiales y temperaturas, es estable y viable, siendo Hap-amino el material con menor viabilidad del proceso de adsorción.

Lista de cuadros

		<i>Número de página</i>
Cuadro I.	Principales propiedades de la hidroxiapatita. (Adaptado de Dorozhkin, 2012).	3
Cuadro II.	Metodologías utilizadas en la síntesis de hidroxiapatita.	4
Cuadro III.	Factores relacionados con el medio y el ADN, que afectan su interacción con hidroxiapatita.	9
Cuadro IV.	Métodos de transfección génica, ventajas y desventajas. (Adaptado de Kim & Eberwine, 2010).	10
Cuadro V.	Características de hidroxiapatitas sintetizadas a pH 5, 7 y 9.	13
Cuadro VI.	Características de los materiales funcionalizados por Rojas et al. (Rojas et al, 2015).	13
Cuadro VII.	Volúmenes para la preparación de los pocillos a diferentes concentraciones de Hap.	25
Cuadro VIII.	Preparación de las mezclas Hap-ADN para la elaboración de isotermas de adsorción.	27
Cuadro IX.	Tamaño de partícula de los nanomateriales.	33
Cuadro X.	Potencial ζ de las nanopartículas de hidroxiapatita, determinado en suspensiones de 1 mg/mL (n=10).	35
Cuadro XI.	Valores promedio de la capacidad de adsorción máxima (Qm) y de la constante de Langmuir (K), para cada uno de los materiales, a 27 °C, 37 °C y 44 °C (n=3).	42
Cuadro XII.	Valores de energía libre de Gibbs de adsorción para cada material, a las diferentes temperaturas estudiadas.	45
Cuadro XIII.	Rendimiento de transfección del plásmido codificante para GFP en el linaje celular HEK 293t, utilizando co-precipitación alcalina con fosfatos, polietiliminina (PEI) y nanopartículas de hidroxiapatita.	51

Lista de figuras

		<i>Número de página</i>
Figura 1.	Celda unitaria de la hidroxiapatita. (Fihri et al., 2017).	2
Figura 2.	Espectros FTIR de una hidroxiapatita natural de huesos bovinos (línea continua de color rojo) y una hidroxiapatita sintética (línea continua de color negro). (Adaptado de Mezahi et al., 2009)	5
Figura 3.	Representación del modelo de capa superficial hidratada para nanocristales de apatita. (Adaptado de Dorozhkin, 2010).	6
Figura 4.	Representación de las interacciones electrostáticas entre ADN y Hap. (Adaptado de Del Valle et al., 2014). (a) Atracciones PO_4^{-2} (ADN) y Ca^{+2} (Hap) (b)Repulsiones PO_4^{-2} (ADN) y OH^{-1} (Hap).	8
Figura 5.	Esquema de interacción entre las moléculas de funcionalización y la superficie de la hidroxiapatita Hap-7. (Adaptado de Rojas et al., 2015).	14
Figura 6.	Esquema de la formación de la doble capa eléctrica de una partícula de carga negativa, en suspensión. (Adaptado de Samimi et al., 2019).	15
Figura 7.	Representación de la conversión del MTT a formazán.	16
Figura 8.	Reacción de Griess.	17
Figura 9.	Isotermas de adsorción de albúmina de suero bovino (ASB) sobre diferentes apatitas (HA: hidroxiapatita, Zn-HA: hidroxiapatita con iones zinc en su superficie, Ap: apatita, Ap-Zn:apatita con iones zinc en su superficie. (Adaptado de Louihi et al., 2019).	18
Figura 10.	Isotermas de adsorción de ADN en Hap a diferentes condiciones. (Adaptado de Chen et al., 2007).	18
Figura 11.	Métodos para cuantificar el rendimiento de transfección celular. (a) Micrografía de un ensayo de inmunofluorescencia (Motskin et al., 2011), (b) Histograma de fluorescencia de citometría de flujo (Clift et al., 2008).	20

	<i>Número de página</i>
Figura 12. Espectro infrarrojo de la hidroxiapatita funcionalizada con anhídrido succínico (Hap-anhsuc).	31
Figura 13. Gráficos del tamaño de partícula en función de la intensidad de la luz dispersada.	32
Figura 14. Micrografías del cultivo celular RAW 264.7, incubados con las nanopartículas de hidroxiapatita, a una concentración de 0,10 mg/mL.	36
Figura 15. Efecto de Hap-suc en la viabilidad celular de células Raw 264.7, a diferentes concentraciones (n=9).	37
Figura 16. Efecto de las nanopartículas de hidroxiapatita en la viabilidad celular (n=9).	38
Figura 17. Efecto de las nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas, en la viabilidad celular y producción de NO (n=9).	39
Figura 18. Ejemplos de las isotermas de Langmuir en su forma no linealizado (figuras A y C) y linealizado (figuras B y D).	41
Figura 19. Gráfico de los valores de Qm calculados, para cada material, a diferentes temperaturas.	43
Figura 20. Dispersogramas del análisis por citometría de flujo del control positivo y negativo, de la transfección celular con plásmido codificante para GFP.	47
Figura 21. Histograma de la transfección celular con plásmido codificante para GFP. Los gráficos son representativos de los experimentos (n=4).	48
Figura 22. Rendimiento de la transfección celular en un cultivo de células HEK 293t, con los materiales funcionalizados y Hap-7, como vector de transfección de GFP (n=4).	50

Figura 23. Comparación de la transfección celular con plásmido codificante para GFP, mediante polietilenimina (PEI), coprecipitación alcalina con fosfatos y nanopartículas de hidroxiapatita. La línea A y C corresponden a las imágenes de epifluorescencia que muestran los núcleos en azul (DAPI) y las líneas B y D las imágenes de epifluorescencia de las células que expresan GFP (n=4).

52

Lista de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico
ASB: albúmina de suero bovino
Ca/P: relación calcio fosfato
C+: control positivo
C-: control negativo
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: dimetilsulfóxido
dsADN: ácido desoxirribonucleico de doble hebra
 ΔG_{ads} : energía libre de Gibbs de adsorción
 ΔH_{ads} : entalpía de adsorción
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
FBS: fetal bovine serum (suero fetal bovino)
Fosfatos: kit comercial de transfección celular, de fosfato de calcio
GFP: green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)
Hap: hidroxiapatita
Hap-5: hidroxiapatita sintetizada a pH 5
Hap-7: hidroxiapatita sintetizada a pH 7
Hap-9: hidroxiapatita sintetizada a pH 9
Hap-amino: hidroxiapatita funcionalizada superficialmente con dihidrógenofosfato de 2-aminoetilo
Hap-anhsuc: hidroxiapatita funcionalizada superficialmente con anhídrido succínico
Hap-suc: hidroxiapatita funcionalizada superficialmente con succinimida
K: constante de Langmuir
mARN: ácido ribonucleico mensajero
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
N: número de réplicas
NO: óxido nítrico
ONS: óxido nítrico sintasa
pADN: plásmido de ADN
pb: pares de bases
PEI: polietilenimina
Q-Q: cuantil - cuantil
Qm: capacidad de adsorción máxima teórica del adsorbato
ssADN: ácido desoxirribonucleico de hebra simple
TBE: tris, botato, EDTA

Lista de apéndices

		<i>Número de página</i>
Apéndice 1.	Espectro infrarrojo del material Hap-suc.	65
Apéndice 2.	Espectro infrarrojo del material Hap-amino.	65
Apéndice 3.	Micrografías del cultivo celular RAW 264.7, incubados con las nanopartículas de hidroxapatita, a una concentración de 0,05 mg/mL y 0,20 mg/mL. (Aumento 10X. La escala en el margen inferior derecho corresponde a 200 μ m).	66
Apéndice 4.	Análisis estadístico de los resultados del ensayo de citotoxicidad con MTT, para los materiales no funcionalizados.	67
Apéndice 5.	Análisis estadístico de los resultados del ensayo de citotoxicidad con MTT, para los materiales funcionalizados.	68
Apéndice 6.	Análisis estadístico de los resultados de la producción de NO, para los materiales no funcionalizados.	69
Apéndice 7.	Análisis estadístico de los resultados de la producción de NO, para los materiales funcionalizados.	70
Apéndice 8.	Electroforesis del ADN fragmentado, en gel de agarosa. La línea "A" corresponde al marcador de peso molecular y la línea "B" al ADN fragmentado. Los asteriscos (*) determinan el inicio y final de la banda.	71
Apéndice 9.	Resultados y análisis estadísticos de las isothermas de adsorción de Langmuir, para Hap-5.	72
Apéndice 10.	Resultados y análisis estadísticos de las isothermas de adsorción de Langmuir, para Hap-7.	73
Apéndice 11.	Resultados y análisis estadísticos de las isothermas de adsorción de Langmuir, para Hap-9.	74
Apéndice 12.	Resultados y análisis estadísticos de las isothermas de adsorción de Langmuir, para Hap-suc.	75
Apéndice 13.	Resultados y análisis estadísticos de las isothermas de adsorción de Langmuir, para Hap-anhsuc.	76

Apéndice 14.	Resultados y análisis estadísticos de las isothermas de adsorción de Langmuir, para Hap-amino.	77
--------------	--	----



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, _____, con cédula de identidad _____, en mi condición de autor del TFG titulado _____

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. **SI** **NO** *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Capítulo I. Introducción

Biomateriales

La nanotecnología es un campo de estudio multidisciplinario que se especializa en el diseño y producción de materiales, controlando la forma y el tamaño a nanoescala (entre 1 nm y 100 nm) (Ramsden, 2018), con el fin de crear materiales con características distintas a las de materiales similares de mayor escala. Estas diferencias incluyen propiedades físicas y químicas como propiedades ópticas, mecánicas, electrónicas y magnéticas, así como diferencias morfológicas y de fenómenos superficiales (Burda, Chen, Narayanan & El-Sayed, 2005), las cuales permitan el desarrollo no sólo de materiales innovadores, sino de dispositivos y sistemas con amplias aplicaciones.

Debido al tamaño de partícula, los nanomateriales pueden interactuar en los mecanismos biológicos, que también se encuentran en la escala nanométrica (Boisseau & Loubaton, 2011), y esto les confiere un gran potencial en aplicaciones biomédicas como adyuvantes y potenciadores del sistema inmune (Torres-Sangiao et al., 2016) y su uso en el transporte de medicamentos, desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico y tratamiento (Martin-Loeches, Forster, & Prina-Mello, 2018), entre otras. El estudio y desarrollo de estas aplicaciones da a lugar al término nanomedicina, que consiste en la aplicación de la nanotecnología en el área de la salud, a través del desarrollo de nanomateriales con nuevas propiedades físicas, químicas y biológicas.

Uno de los principales objetivos de la nanomedicina ha sido brindar posibles soluciones a dificultades que han presentado procedimientos de diagnóstico y tratamiento de la medicina convencional (Nikalje, 2015), como la baja biodisponibilidad, especificidad y biocompatibilidad, a través de técnicas menos invasivas, con periodos de reacción menores, de menor toxicidad y mayor sensibilidad. Los nanomateriales brindan esta oportunidad de innovación y mejora en la medicina porque las interacciones que pueden establecerse entre estos y distintas biomoléculas, pueden regularse mediante la modificación del tamaño, morfología, composición química y superficial, carga, solubilidad, entre otros; y así obtener propiedades biológicas particulares (Oliva et al., 2015).

Sin embargo, uno de los grandes retos de la nanomedicina (Riehemann et al., 2009), ha sido el desarrollo de materiales capaces de interactuar con los sistemas biológicos, ya sea para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar un tejido u órgano o restablecer una función del cuerpo, sin provocar perturbaciones o reacciones de rechazo en los individuos (Dorozhkin, 2009). Este tipo de materiales son denominados biomateriales, y comprende una amplia gama de materiales que incluye biomateriales clásicos como el polimetilmetacrilato, aleaciones metálicas, óxidos y fosfatos de aluminio, calcio y silicio (Shue, Yufeng & Mony, 2012), así como materiales novedosos basados en el autoensamblaje molecular, sintetizados a partir de biomoléculas o sus estructuras (Tibbitt & Langer, 2017).

Algunos ejemplos de estos materiales son las nanopartículas de oro y sus aplicaciones en terapias contra cáncer, biomateriales cerámicos (Ahmadian et al., 2018) utilizados en el tratamiento de caries dentales, nanomateriales de polímeros biológicos y sintéticos (Tang et al., 2016) con aplicaciones en transporte de fármacos, los compuestos de carbono como los nanotubos de carbono (Lu et al., 2019), que han sido probados en imagenología, así como nanomateriales de sílica (Yang & Yu, 2016) utilizados en imagenología molecular y transporte de medicamentos. Otros materiales están conformados por biomoléculas como liposomas (Bueno et al., 2018), ácidos nucleicos (Yuang et al., 2019), péptidos (Strand et al., 2019) u otros componentes inorgánicos que se encuentran naturalmente en los organismos vivos, tales como la hidroxiapatita.

Generalidades de la hidroxiapatita

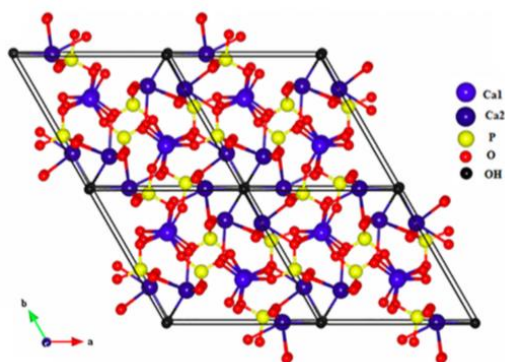


Figura 1. Celda unitaria de la hidroxiapatita. (Fihri et al., 2017)

Las apatitas constituyen un grupo diverso de compuestos sólidos, con una fórmula general que puede expresarse como $Me_{10}(XO_4)_6Y_2$, donde el Me representa un catión de carga +2 (por ejemplo Ca^{+2} , Sr^{+2} o Pb^{+2}), XO corresponde a un ión poliatómico de carga -3, siendo el ión fosfato uno de los más comunes, y Y un anión de carga -1 (Brown & Constantz, 1994). Generalmente presentan un sistema cristalino hexagonal con dos sitios metálicos no equivalentes, identificados como Me(I) y Me(II), siendo el carbonato su principal componente minoritario. La hidroxiapatita (Figura 1) es un fosfato de calcio que pertenece a este grupo de las apatitas, y ha sido ampliamente estudiado, por sus favorables características en aplicaciones biomédicas.

La hidroxiapatita (Hap) es el componente principal de la fase mineral de los huesos (Boskey, 2013), y constituye entre el 60% y 70% del peso total del hueso (seco), para la mayoría de huesos y especies. En hueso, el fosfato de calcio se encuentra inmerso entre la red de colágeno de los huesos, como cristales en forma de placas o agujas, con dimensiones aproximadas de 50 nm a 100 nm de longitud, de 25 nm a 50 nm de ancho y entre 4 nm y 6 nm de espesor (Su et al., 2003). Este complejo de fosfato de calcio-colágeno forma colágeno mineralizado y es el precursor del tejido biológico mineralizado de los tendones, piel, huesos y dientes. En el Cuadro I se muestra la fórmula molecular de la forma estable de Hap en condiciones fisiológicas, la cual es insoluble y consiste en cerca de un 39% en peso de calcio y 18% en peso de fosfato, dando como resultado la fracción molar indicada en este mismo cuadro.

Cuadro I. Principales propiedades de la hidroxiapatita. (Adaptado de Dorozhkin, 2012)

Fórmula molecular	Relación molar de Ca/P	Solubilidad a 25 °C	Rango de pH de estabilidad en disolución a 25 °C
$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67	0,3 mg/L	9,5 - 12

La hidroxiapatita se puede obtener de manera sintética por diversas técnicas, las cuales pueden clasificarse como: técnicas “secas” basadas en tratamientos de aplicación de calor a altas temperaturas, técnicas “húmedas” cuyas reacciones se llevan a cabo en un medio acuoso o disolventes orgánicos, las asistidas por fuentes de energía adicionales y otras o misceláneas (Fihri et al., 2017), dentro de las cuales se incluyen las síntesis a partir de fuentes biogénicas como huesos de animales y métodos mecánicos como el “ball milling” (molienda mecánica) (Szcześ et al., 2017). En el Cuadro II se resumen algunas de estas técnicas. Cabe destacar que cada una de ellas muestra

ventajas y desventajas, según el uso específico que se le quiera dar al material, pues existen diferencias en la morfología, tamaño, cristalinidad, homogeneidad, porosidad y otras características, de la hidroxiapatita que se obtiene a través de cada técnica (Sadat-Shojai et al., 2013).

Cuadro II. Metodologías utilizadas en la síntesis de hidroxiapatita.

Tipo de metodología	Ejemplos	Referencia
Secas	Calcinación de mezcla de reactivos	Guo et al., 2013
Húmedas	Co-precipitación	Zhang et al., 2020
	Emulsiones	Huang et al., 2019
	Sol-gel	Sebastian et al., 2020
	Reacciones hidrotérmicas	Chesley et al., 2020
	Electroquímicas	Nur et al., 2014
Asistidas	Asistidas por microondas	Chen et al., 2020
	Asistidas por radiación ultrasónica	Rouhani et al., 2010
Otras	Inspiradas en sistemas biológicos	Guha et al., 2010

Al comparar las propiedades de la hidroxiapatita natural y sintética, que son muy similares, con algunas diferencias. Por ejemplo, en la Figura 2 se muestra una superposición del espectro infrarrojo de hidroxiapatita de ambas fuentes. En este se observa que las principales señales coinciden. Sin embargo, se han observado diferencias en composición, por ejemplo en la relación Ca/P que suele ser menor en las Hap sintéticas, y por ello son denominadas como Hap deficientes en calcio, así como diferencias en su interacción con los sistemas biológicos (Mezahi et al., 2009). Se conoce que las hidroxiapatitas naturales pueden mostrar diferencias en la cristalinidad, relación Ca/P y en el porcentaje y presencia de trazas de carbonatos, cloro, flúor, magnesio y sodio, las cuales están relacionadas con las propiedades y bioactividad específicas, del tejido en que se encuentre (Rivera-Muñoz, 2011).

Por esta razón, la reactividad de las hidroxiapatitas sintéticas pueden variar respecto a las naturales, dependiendo del tejido y las características del material, por ejemplo, la relación Ca/P, cuyos valores cercanos a 1,67 se relacionan con materiales estables en el cuerpo humano, pero con una tendencia a ser muy inertes, mientras que las Hap con valores mayores a esa magnitud, muestran mayor bioactividad (Rivera-Muñoz, 2011). A pesar de estas diferencias, las Hap sintéticas mantienen características importantes del material biogénico (Holzapfel et al., 2013), tales como

biocompatibilidad no solo con el tejido duro sino también con el tejido blando, la capacidad de integrarse biológicamente cuando se implanta directamente en un defecto óseo, la ausencia de un efecto nocivo sobre el sistema inmune y biodegradabilidad, principalmente por mecanismos de resorción celular (Turón et al., 2017).

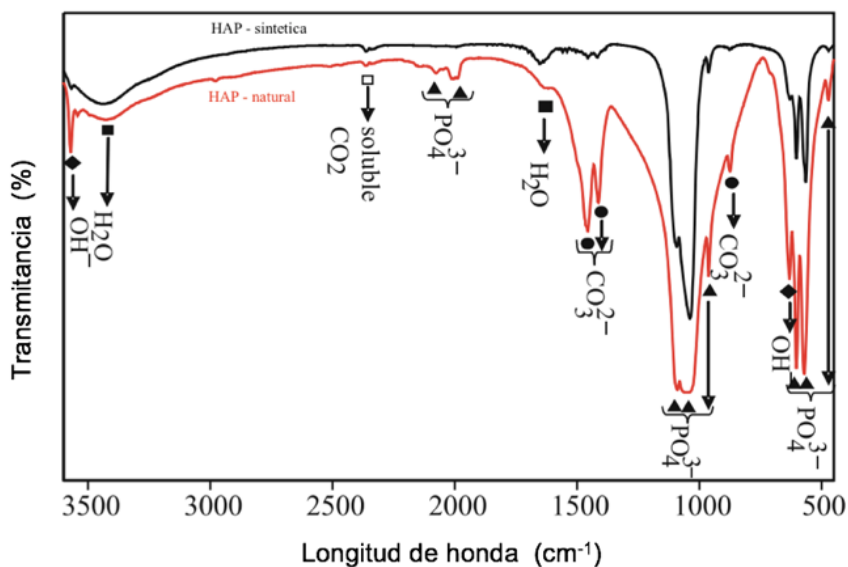


Figura 2. Espectros FTIR de una hidroxiapatita natural de huesos bovinos (línea continua de color rojo) y una hidroxiapatita sintética (línea continua de color negro). (Adaptado de Mezahi et al., 2009)

Además, presenta una química de superficie que facilita la adsorción de biomoléculas, muestra un potencial osteoinductivo, es decir, que promueve la fijación de la formación de células específicas del tejido óseo, y presenta un comportamiento osteoconductor, relacionado con su capacidad de actuar como soporte estructural en la formación y crecimiento de nuevo hueso (Zhou & Lee, 2011), es casi insoluble en condiciones fisiológicas y es considerada como un material no inmunogénico, con baja o nula toxicidad (Motskin et al., 2009). Dadas estas características la hidroxiapatita, se ha utilizado en la fabricación de implantes dentales (Svanborg et al., 2011) y ortopédicos (Farokhi et al., 2018). Además se ha estudiado la posibilidad de implementarla en el tratamiento de enfermedades como el cáncer (Hou et al., 2009) u otras enfermedades, como vehículo de fármacos (Son et al., 2019) y terapia génica (Tenkumo et al., 2016). Otras aplicaciones

biomédicas de Hap incluyen el desarrollo de vacunas (Hayashi et al, 2016) y su uso en imagenología clínica (Machado et al., 2019), entre otros.

Cabe destacar que el potencial de la hidroxiapatita va más allá de sus aplicaciones biomédicas, puesto que ha mostrado ser un buen material en otras aplicaciones que incluyen su uso como fase estacionaria en técnicas cromatográficas para la separación de proteínas, aminoácidos y otras biomoléculas (Cummings, 2014), como catalizador o portador de catalizadores (Zhang et al., 2020) y adsorbente de contaminantes químicos (Venkatesan, Hassan & Ryu, 2019), entre otras. Esta funcionalidad múltiple de Hap, no sólo está relacionada con las características anteriormente mencionadas, sino que también se debe a las ventajas del uso del material a escala nanométrica y con modificaciones superficiales.

Existe un gran interés en el estudio de las nanopartículas de hidroxiapatita ya que al disminuir el tamaño de partícula, aumenta la razón superficie-volumen y por ende la superficie adquiere una mayor importancia con respecto al material a granel (Madia, 2006) y su interacción con los sistemas biológicos. En comparación con los ortofosfatos de calcio en tamaño convencional, las nanopartículas de Hap no sólo presentan un aumento en la superficie, sino también una disminución en el ángulo de contacto, un menor diámetro en los poros del material, mayor adsorción de biomoléculas, mayor cristalinidad, bioactividad, biocompatibilidad y adhesión celular y entre otras características (Dorozhkin, 2010). Algunas de estas diferencias se han relacionado con la existencia de una capa superficial hidratada con iones lábiles (Figura 3) que le permiten interactuar con el medio de manera distinta a como lo hace el material de tamaño convencional (Drouet et al., 2009).

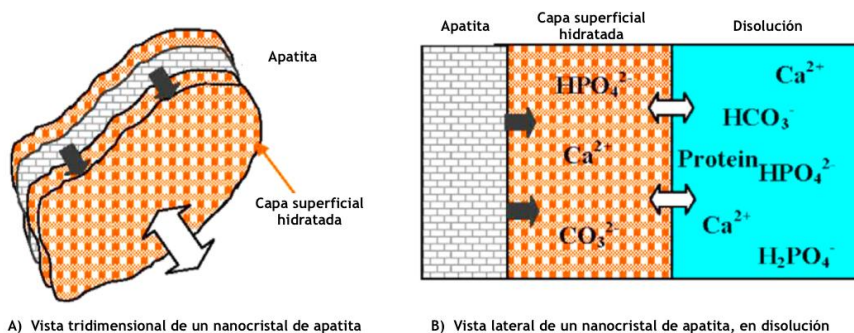


Figura 3. Representación del modelo de capa superficial hidratada para nanocristales de apatita. (Adaptado de Dorozhkin, 2010)

Dadas las propiedades de la hidroxiapatita, la modificación superficial constituye un recurso adicional para la modificación de las características de estos materiales y sus potenciales aplicaciones. Esta modificación está relacionada con la sustitución o adición de iones o moléculas en la superficie del material, con el fin de modular las propiedades del material (Xu et al., 2016). Dentro de los compuestos con los que se ha modificado la superficie de las hidroxiapatitas se encuentran ácidos inorgánicos (Tanaka, Futaoka, & Hino, 2004), alcoholes, lactonas (Wang, Dai, Zhang, Xiao, & Lang, 2010) y especies con silicio como el hexametildisilano, y tetraetilortosilicato. También se han utilizado compuestos con grupos nitrogenados (Pighinelli & Kucharska, 2013), fluoruro (Aissa, Agougui, & Debbabi, 2011), especies fosfatadas (Aissa et al., 2007), polímeros (Talal et al., 2009) e iones metálicos (Tampieri et al., 2012), entre otros.

Se han propuesto diversas aplicaciones basadas en el uso de las nanopartículas de hidroxiapatita en la nanomedicina, tanto en pruebas de diagnóstico como en terapia (Rogers, Adams, & Pennathur, 2013). Adicionalmente, varios estudios han llegado a la conclusión que los sistemas de administración de medicamentos desarrollados con nanotecnología, pueden aportar grandes mejoras en el tratamiento de enfermedades (Boisseau & Loubaton, 2011). Sin embargo, Boisseau y Luobaton advierten que la reacción del organismo a los sistemas utilizados en nanomedicina no ha sido caracterizada completamente.

Dentro de las aplicaciones destaca el uso de nanopartículas de Hap como vehículo de medicamentos (Sadat-Shojai, Khorasani, Dinpanah-Khoshdargi, & Jamshidi, 2013), principalmente en procedimientos que requieren una liberación controlada de los compuestos activos, una vez que ingresan al organismo. Esta liberación controlada es facilitada por la estabilidad de la hidroxiapatita a pH fisiológico y la capacidad de disolverse a valores de pH ácidos, características que les confiere un potencial en el direccionamiento dentro del organismo, según el pH del medio (Kester et al., 2008; Morgan et al., 2008).

Además de vehículo de medicamentos, se ha propuesto que el uso de nanomateriales puede aumentar la eficiencia con que se transporta material genético al interior de las células y optimizar el transporte de este al sitio en que es requerido. Estudios han concluido que es posible utilizar las nanopartículas como portador de ADN, ya que presentan un tamaño adecuado para su incorporación por endocitosis y sin presentar un efecto tóxico en los sistemas biológicos (Kakizawa

& Kataoka, 2002). En el caso específico de las nanopartículas de hidroxiapatita, se ha realizado investigación en torno a la entrega intracelular de mRNA, ADN Y proteínas (Wu et al., 2010), la caracterización de la interacción entre estas biomoléculas y el material, y las variables que afectan su funcionalidad en terapia génica (Chowdury & Akaike, 2007).

Interacción de la hidroxiapatita con ácidos nucleicos

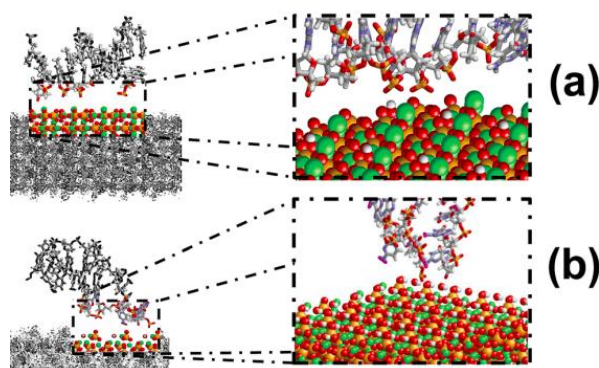


Figura 4. Representación de las interacciones electrostáticas entre ADN y Hap. (Adaptado de Del Valle et al., 2014). **(a)** Atracciones PO_4^{2-} (ADN) y Ca^{+2} (Hap). **(b)** Repulsiones PO_4^{2-} (ADN) y OH^{-1} (Hap).

La interacción de la hidroxiapatita con ADN ha sido estudiada principalmente por su aplicación en la purificación de ADN y su uso como vector en terapia génica. Se ha determinado que la interacción con el ADN es un proceso endotérmico complejo pero favorable (Chen et al., 2007), desde el punto de vista termodinámico, basado en interacciones electrostáticas representadas en la Figura 4, las cuales consisten principalmente en la atracción entre los iones fosfatos del ADN y los iones calcio de la superficie del material, y la repulsión entre los fosfatos del ADN y los iones hidroxilo de la superficie del material (Del Valle et al., 2014). Estas interacciones electrostáticas pueden variar, según las diferencias en la temperatura, el pH y la salinidad del medio, así como el tipo de ADN, ya sea doble hebra (ds, por sus siglas en inglés) o de hebra simple (ss, por sus siglas en inglés) y el contenido de guanina y citosina del ADN (Chen et al., 2007). Algunos de los patrones observados en estas diferencias, se muestran en el Cuadro III.

Las características del material también son factores que influyen en la interacción con el ADN, pues se ha determinado que en materiales con diferencias en factores como el potencial ζ , la

relación Ca/P, el tamaño, el porcentaje de carbonato y cristalinidad, se observa una diferencia en la cantidad de ADN adsorbido y su eficiencia al ser internalizado por las células (Del Valle et al., 2014). Cabe destacar que no existe evidencia que una mayor cantidad de ADN adsorbido en el material implique una mayor eficiencia de transfección (Chowdhury et al., 2006). Sin embargo, las características del material podrían propiciar la estabilidad del complejo “Hap-ADN” o interacciones que alteren la estructura del ADN, lo cual puede resultar en un mecanismo de protección ante sistemas de degradación química y enzimática, y por ende, un aumento en la posibilidad de favorecer la eficiencia de la transfección génica (Chowdhury et al., 2006).

Cuadro III. Factores relacionados con el medio y el ADN, que afectan su interacción con hidroxiapatita.

Condición	Efecto (Chen et al., 2007)
Salinidad del medio	Si aumenta: aumenta la afinidad del ssADN y disminuye la del dsADN.
Temperatura	Si aumenta: aumenta la afinidad del ssADN y no influye significativamente en la afinidad del dsADN.
Contenido de GC del ADN	Un alto porcentaje de GC se asocia con alta estabilidad del ADN, lo cual aumenta la afinidad.
Estructura secundaria	Los fragmentos grandes de ssADN pueden comportarse como dsADN, debido a la formación de estructuras secundarias, por ejemplo estructuras “hairpin”.

La terapia génica implica la introducción de genes en una célula, a través de vectores de transporte de genes, proceso conocido como transfección celular. A través de la terapia génica se podría ejercer un efecto, ya sea reemplazando un gen faltante, induciendo la sobreexpresión de un gen o modulando la expresión de genes (Raftery et al., 2016). Para lograr esto, generalmente se utilizan, plásmidos de ADN (pADN) no virales que se eliminan del sistema con relativa rapidez y tienen un costo de producción menor que la de otros tipos de ADN o proteínas recombinantes. Sin embargo, el suministro de pADN tanto a nivel anatómico como celular es difícil, debido a que suelen ser macromoléculas muy grandes (1–200 kbp), con una carga aniónica debido sus grupos

fosfodiéster, que reduce su probabilidad de internalización celular y que les hace susceptibles a la degradación por nucleasas.

Debido a estas dificultades, se requieren sistemas de entrega sofisticados y eficientes, que permitan la entrega sistémica dirigida y controlada de pADN. Esos sistemas pueden incluir vectores virales como lentivirus, adenovirus y retrovirus, o bien vectores no virales, representados por quitosano, ciclodextrinas, polímeros y fosfatos de calcio, entre otros (Raftery et al., 2016). En comparación con los vectores virales, los vectores no virales presenta ciertas ventajas, debido a su menor toxicidad e inmunogenicidad. En el Cuadro IV se comparan algunos ejemplos de métodos de transfección génica, los cuales pueden agruparse en tres principales categorías: métodos biológicos, químicos y físicos.

Cuadro IV. Métodos de transfección génica, ventajas y desventajas. (Adaptado de Kim & Eberwine, 2010)

Tipo	Ejemplos	Ventajas	Desventajas
Biológicos	Virus: lentivirus, adenovirus y retrovirus	Alta eficiencia y especificidad	Riesgos por toxicidad, inmunogenicidad y posible mutagénesis
Químicos	Polímeros, lípidos catiónicos y dendrímeros.	Amplia diversidad de vectores con alta eficiencia.	Leve toxicidad, baja reproducibilidad y especificidad.
Físicos	Microinyección directa, entrega biolística de partícula, electroporación, irradiación láser, sonoporación y magnetofección	Son métodos simples que no requieren vectores de transfección.	Requiere equipamiento complejo y puede alterar la estructura del ADN.

La hidroxiapatita presenta las características ideales de un vector de transfección, considerando que no es un material tóxico ni inmunogénico, es estable durante su almacenamiento, biodegradable en los sistemas vivos y capaz de ser internalizado en células blanco para producir una adecuada expresión génica (Pouton & Seymour, 2001). Se clasifica como un vector no viral de tipo químico, el cual puede emplearse en procesos de transfección basados en la incubación de las nanopartículas de Hap con el ADN libre (Liu et al., 2011). Como vector de transfección, el complejo Hap-ADN es internalizado por las células a través de diferentes procesos

endocíticos los cuales dependen de la interacción del sistema nanomaterial-célula que está determinada por la estructura y características fisicoquímicas del nanomaterial (Sahay , Alakhova & Kabanov, 2010).

Se ha estudiado el mecanismo de internalización de nanopartículas de hidroxiapatita con diferentes características, y se ha determinado que el ingreso a la célula se puede dar a través de diferentes procesos endocíticos como endocitosis (Olton et al., 2011), fagocitosis (Nakayama, 2018) y los mediados por clatrina (Bauer et al., 2008), entre otros. Cabe destacar que la formación de aglomerados es una condición no deseable en la transfección génica ya que puede significar una disminución en el rendimiento de la transfección, relacionada con el gran tamaño del material a ingresar en la célula. Para evitarlos, se han implementado modificaciones superficiales del material con glucosa (Komuro et al., 2018), que han mejorado la eficiencia de transfección, pues reduce la formación de aglomerados y el crecimiento cristalino, así como brindar posibles nuevas rutas de internalización a través de transportadores de glucosa.

La adición de electrolitos como CaCl_2 y NaCl también se han utilizado satisfactoriamente para disminuir la formación de aglomerados, sin embargo, dependiendo de las condiciones del medio, la presencia de estos iones podría llegar a reducir la interacción entre Hap y el ADN, disminuyendo así la cantidad de ADN adsorbido (Hossain et al., 2010). A pesar de que la formación de aglomerados es una condición no deseable, se reportan estudios donde dichos aglomerados son internalizados en células a por mecanismos mediados por clatrina (Bauer et al., 2008), pero que muestran un toxicidad inesperada, debido a la liberación de grandes cantidades del nanomaterial en el interior de la célula que conlleva la desestabilización de la célula.

Al darse la endocitosis, las nanopartículas no alcanzan directamente el citoplasma, sino que se encuentran localizadas en vesículas delimitadas por membranas conocidas como endosomas. Si estos endosomas se fusionan con lisosomas, vesículas ácidas que contienen enzimas de degradación, el complejo Hap-ADN es degradado y el ADN es liberado y translocado hacia el núcleo para su respectivo proceso de expresión génica. En esta etapa, la estabilidad de las nanopartículas es un factor determinante en la liberación de este ADN, ya que si su estabilidad es muy alta en el valor de pH al que se realiza la degradación (aproximadamente pH 5), será menos eficiente la separación del complejo Hap-ADN (Chowdury et al., 2006). En este aspecto, los vectores donde el

ADN se encuentra embebido presentan una desventaja frente a aquellos donde el ADN se encuentra solamente adsorbido sobre su superficie, pues requieren de la disolución del material para liberar dicho ADN.

Además de la estabilidad de Hap a diferentes valores de pH, es importante destacar que su tamaño influye en la eficiencia de la transfección, no sólo en términos del ingreso a la célula sino también por la protección que puede brindar al ADN. Se ha evaluado la eficiencia de transfección de fosfatos de calcio de diferentes tamaños y se determinó que la premisa de que mientras más pequeño sea el material mejores resultados se obtendrán en la transfección génica, no es siempre cierta, puesto que materiales con tamaños menores a 25 nm mostraron resultados pobres (Lee, Upadhye & Kumta, 2012). Esto puede correlacionarse con el aspecto de protección del ADN dentro de la célula, pues partículas muy pequeñas no permiten el cambio de presión osmótica relacionado con la maduración del endosoma en lisosoma, la cual incluye una disminución del pH que disuelve el material, y el ingreso de agua a la vesícula. Estos eventos producen la ruptura de la vesícula y la liberación del ADN disociado del material, sin embargo, en este caso particular, sin la ruptura del lisosoma, el ADN es degradado dentro de este y no logra llegar al núcleo celular.

Algunos factores que pueden modularse para optimizar la eficiencia del material como vector de transfección son: la relación Ca/P que también influye sobre el tamaño del material; el porcentaje de iones carbonato presentes en la síntesis de las nanopartículas, ya que el ion carbonato facilita la disolución de la Hap a pH 5 (Chowdury, & Akaike, 2007) y las modificaciones superficiales. El recubrimiento de las nanopartículas con moléculas de bioseñalización, como las proteínas y anticuerpos pueden favorecer la especificidad y eficiencia en la internalización, o bien, al funcionalizar las superficies de hidroxiapatita con compuestos que favorezcan la interacción del ADN con el material.

Materiales de estudio

En la Universidad de Costa Rica, el grupo de trabajo dirigido por la doctora Mavis Montero, desarrolló un método sencillo para la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita, basado en la electrólisis de una disolución saturada de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), iones calcio e iones fosfato. Esta síntesis se puede realizar en un solo paso (Montero et al., 2006) y permite la

obtención controlada de cristales de hidroxiapatita carbonatada, mediante la modificación del pH del medio de síntesis. En este método, se determinó que el tamaño del material y el porcentaje de carbonato es dependiente del pH del medio de la reacción (pH entre 4 y 13) (Montalbert-Smith et al., 2009). En el Cuadro V se muestran algunas de las características de las hidroxiapatitas sintetizadas con este método a pH 5 (Hap-5), 7 (Hap-7) y 9 (Hap-9), las cuales muestran una morfología plana, similar a escamas.

Cuadro V. Características de hidroxiapatitas sintetizadas a pH 5, 7 y 9.

Material	Relación Ca/P	Tamaño (nm)	Porcentaje de CO ₃ ²⁻ (%)
Hap-5	1,46	31	2,33
Hap-7	1,55	23	2,26
Hap-9	1,60	19	5,30

El grupo de trabajo también ha introducido el estudio de modificaciones en la superficie de las nanopartículas, con compuestos orgánicos como anhídridos, aminas, amidas y grupos hidrófobos (Rojas et al., 2015), con el fin de ampliar el potencial de las Hap sintetizadas por el grupo de trabajo. Se han utilizado los materiales sintetizados con el método desarrollado por el grupo, utilizando electrodos de placas paralelas y la funcionalización superficial a través de un sistema de reflujo. En el Cuadro VI se muestran algunas características de los materiales no funcionalizados con succinimida, anhídrido succínico y dihidrógenofosfato de 2-aminoetilo, sintetizados a partir de Hap-7, los cuales presentan una morfología plana, similar a escamas, todos con un tamaño de partícula de 30 nm ± 2 nm y un porcentaje de carbonato de 0,3%.

Cuadro VI. Características de los materiales funcionalizados por Rojas et al (Rojas et al, 2015)

Funcionalización	Cobertura (%)	Potencial ζ (mV, a pH 7)
Ninguna (Hap-7)	-	-15
Succinimida (Hap-suc)	35	-8,4
Anhídrido succínico (Hap-anhsuc)	64	-4,1
Dihidrógenofosfato de 2-aminoetilo (Hap-amino)	-	-6,4

La determinación de las características fisicoquímicas permitió evidenciar la funcionalización de material, y elucidar el tipo de interacción establecida. En el caso de las funcionalizaciones con succinimida y anhídrido succínico se identificaron interacciones iónicas de las

moléculas con Hap, mientras que para el dihidrógenofosfato de 2-aminoetilo, se plantea la formación de un enlace pirofosfato, entre los grupos fosfato del compuesto y de Hap (Figura 5). De esta manera los grupos expuestos en la superficie del material son distinto al de la Hap sin funcionalizar y también entre ellas funcionalizadas, brindando así la posibilidad de diferentes actividades o aplicaciones. Dentro de estas aplicaciones se ha propuesto el uso de los materiales como vectores de transfección génica, sin embargo, para determinar su potencial en esta aplicación se requieren análisis adicionales que permitan identificar su biocompatibilidad (toxicidad e inmunogenicidad), su interacción con el ADN, y la capacidad de los sistemas biológicos de internalizar los materiales. Para estos fines, pueden realizarse diferentes ensayos con cultivos celulares, que brinden información sobre la posible interacción de las nanopartículas con los sistemas biológicos.

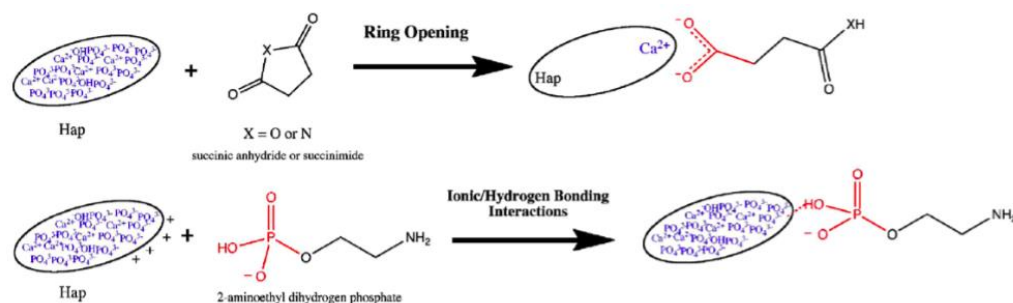


Figura 5. Esquema de interacción entre las moléculas de funcionalización y la superficie de la hidroxiapatita Hap-7. (Adaptado de Rojas et al., 2015)

Ensayos y técnicas de análisis

El potencial ζ es un parámetro relacionado con la estabilidad de una suspensión y que depende de la composición del nanomaterial y el medio en el que se encuentra. Este se mide a través de la microelectroforesis de láser Doppler, que es una técnica utilizada para medir la movilidad electroforética de partículas en dispersión, la cual depende de la carga de las partículas en suspensión y puede convertirse a potencial ζ . Este parámetro corresponde a la diferencia de potencial que existe entre la capa difusa del disolvente que rodea el material, en la suspensión, tal como se muestra en el esquema de la Figura 6 (Samimi et al., 2019).

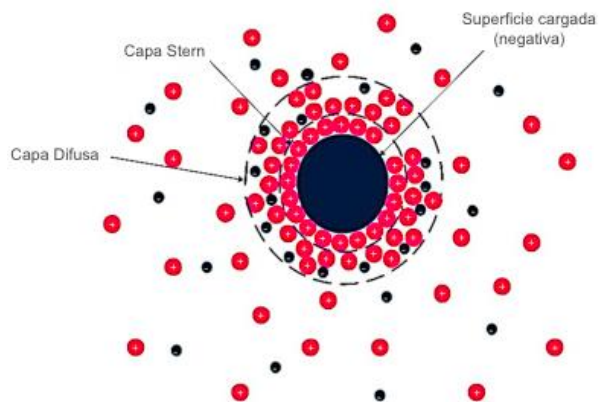


Figura 6. Esquema de la formación de la doble capa eléctrica de una partícula de carga negativa, en suspensión. (Adaptado de Samimi et al., 2019)

Este parámetro está relacionado con el grado de repulsión que se esperaría observar entre partículas cargadas en una dispersión, de tal forma que valores altos de potencial ζ , están relacionados con partículas altamente cargadas, lo cual evita la agregación de las partículas debido a la repulsión eléctrica. Por el contrario, si la magnitud del potencial ζ es bajo, la atracción supera la repulsión y es probable que se observe la formación de coágulos. El valor de potencial ζ mayor o igual a -30 mV se considera óptimo para una buena estabilización de una nanodispersión. Cabe destacar que los equipos de medición de potencial ζ también permiten la determinación del tamaño de partícula en suspensión, pues combinan la técnica de la microelectroforesis con la dispersión de luz dinámica, que mide la difusión de partículas en movimiento Browniano, y convierte este valor a tamaño y a una distribución de tamaño.

Los ensayos de proliferación celular son ampliamente utilizados en biología celular para estudiar la actividad de factores de crecimiento, nutrientes y agentes citotóxicos. Para determinar el número de células en estos ensayos, se realiza mediante conteo electrónico o métodos colorimétricos relacionados con la actividad metabólica de enzimas celulares. El MTT o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, es un compuesto muy utilizado en este tipo de métodos colorimétricos, el cual se basa en la reducción del MTT a formazán (Figura 7), a través de la captación de electrones producidos en la cadena de transporte de electrones, que es una de las principales actividades metabólicas celulares (Laaksonen et al., 2007). El formazán presenta un absorbancia a 570 nm, que puede ser cuantificada mediante espectrofotometría y su magnitud es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas, es decir, aquellas que no se fueron afectadas ante la presencia de un agente citotóxico.

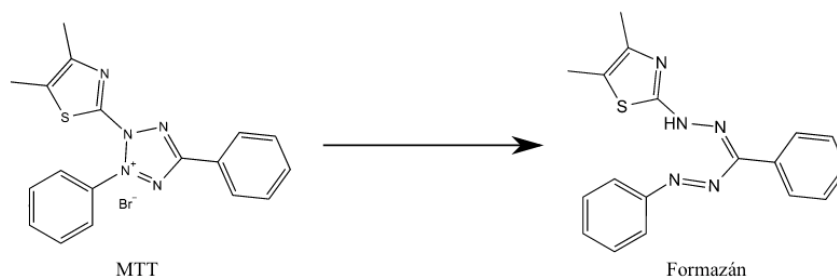


Figura 7. Representación de la conversión del MTT a formazán.

Por otra parte, también existen métodos colorimétricos que permite identificar si un material es inmunogénico, por ejemplo, aquellos basados en la cuantificación del óxido nítrico (NO) producido por un cultivo celular de macrófagos que ha sido incubado previamente con el material de interés. El NO es una sustancia mediadora de señales que cumple papeles importantes en procesos como la defensa antitumoral y el proceso de inflamación, y es producido por la enzima sintetasa del óxido nítrico (ONS, por sus siglas en inglés), que utiliza como sustrato el aminoácido arginina (Korhonen, Lahti, Kankaanranta, & Moilanen, 2005) para producir citrulina y la especie radicalaria de óxido nítrico.

En sistemas biológicos, el NO media directamente su actividad biológica, sin embargo, en cultivo, el NO reacciona con el oxígeno atmosférico oxidándose a nitrito o nitrato. El nitrito puede cuantificarse mediante métodos colorimétricos basados en la reacción de Griess, que consiste en la reacción de diazotización de nitrito con un compuesto amino aromático, tal como se muestra en la Figura 8 para producir una sal de diazonio coloreada. Esta sal presenta una absorbancia a una longitud de onda de 530 nm, cuya magnitud puede ser cuantificada mediante espectrofotometría (Tsikas, 2007) y es relacionada con la capacidad del material para inducir alguna estimulación del sistema inmune.

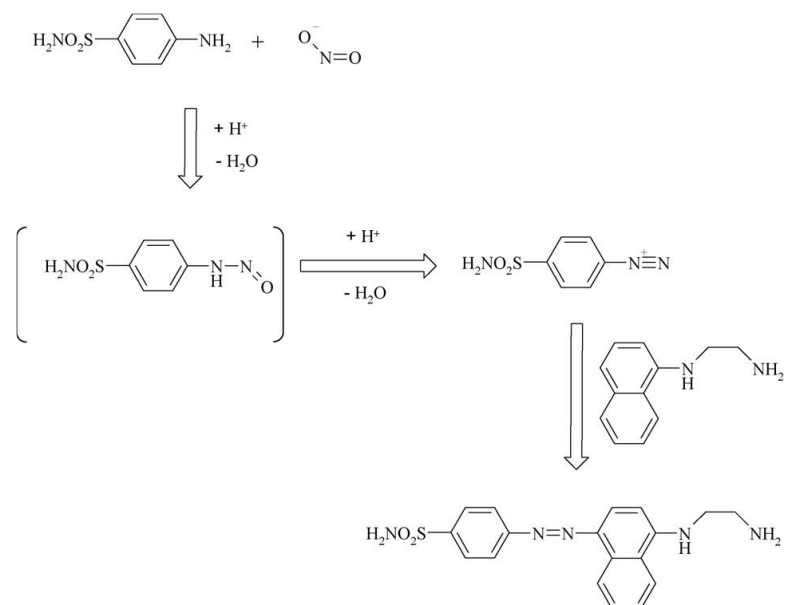


Figura 8. Reacción de Griess.

Dado que el ADN presenta un máximo de absorción a 260 nm, la espectrofotometría también puede ser de utilidad para su cuantificación en experimentos de adsorción sobre materiales. Estos experimentos están basados en la construcción de perfiles o isothermas de la adsorción, que permiten describir el fenómeno que rige la retención, liberación o movilidad del adsorbato, en relación con el adsorbente, a una temperatura constante (Limousin et al., 2007). Los parámetros físico-químicos que estos modelos incluyen, brindan información sobre el mecanismo de adsorción, propiedades de la superficie, así como el grado de afinidad de los adsorbentes y facilitan la interpretación de los parámetros termodinámicos (Allen, McKay, & Porter, 2004).

Estos parámetros termodinámicos pueden ser calculados a través de isothermas de adsorción. Las isothermas de Langmuir son utilizadas para cuantificar y comparar el desempeño de diferentes bio-adsorbentes (Foo & Hameed, 2010), asumiendo que la capa adsorbida es una monocapa donde la adsorción sucede en un número finito de sitios localizados, que son idénticos y equivalentes, y una vez que una molécula se encuentra en un sitio no hay más adsorción, pues se alcanza un equilibrio de saturación. En la Figura 9 se muestran isothermas de Langmuir correspondientes a la adsorción de albúmina de suero bovino (ASB) en diferentes apatitas (Louihi et al., 2019), en las que puede observarse la existencia de una concentración constante, que corresponde a la máxima adsorción del ASB sobre el material.

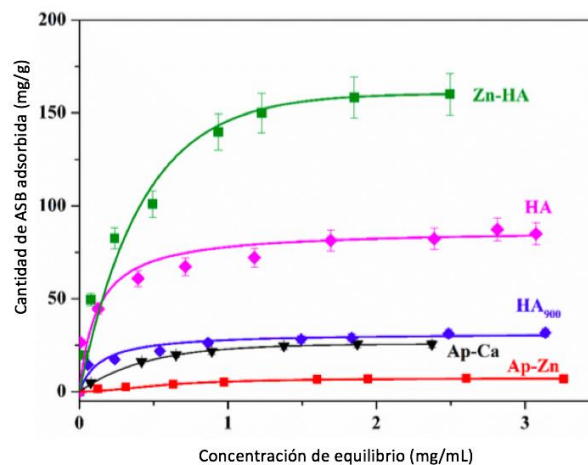


Figura 9. Isotermas de adsorción de albúmina de suero bovino (ASB) sobre diferentes apatitas (HA: hidroxiapatita, Zn-HA: hidroxiapatita con iones zinc en su superficie, Ap: apatita, Ap-Zn: apatita con iones zinc en su superficie). (Adaptado de Louihi et al., 2019)

Existen análisis de la afinidad y adsorción de diversas moléculas sobre carbonatos de calcio e hidroxiapatita, en los que se han identificado un ajuste al modelo de Langmuir (Xue et al., 2009), por ejemplo la adsorción de inmunoglobulina G humana sobre Hap, para su uso como vehículo de medicamentos contra cáncer (Lafisco et al., 2012), la adhesión de proteínas (Mavropoulos et al., 2011), adsorción de compuestos inorgánicos como sulfuros (Tanaka, Tsuda, Nishikawa, & Fuji, 2012), y adsorción y liberación de biomoléculas (Talal et al., 2009), entre otros. En el caso particular de la adsorción de ADN sobre Hap, se ha evidenciado que también se presenta un ajuste al modelo de Langmuir (Chen et al., 2007), tal como se muestra en las isotermas de adsorción de ADN en Hap, a diferentes condiciones (Figura 10).

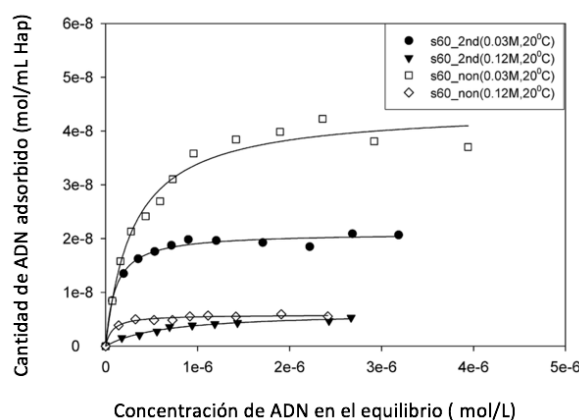


Figura 10. Isotermas de adsorción de ADN en Hap a diferentes condiciones. (Adaptado de Chen et al., 2007)

El modelo de Langmuir se expresa con la siguiente ecuación:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q_m K} + \frac{C_e}{Q_m} \quad \text{[Ecuación 1]}$$

Donde C_e es la concentración del adsorbato (g/L) en el equilibrio, q_e es la cantidad de adsorbato adsorbido sobre la superficie del adsorbente por unidad de masa del adsorbente (g/g), Q_m (g/g) es capacidad de adsorción máxima teórica del adsorbato y K una constante relacionada con el equilibrio del proceso de adsorción y la afinidad de la interacción entre el adsorbente y el adsorbato.

A partir de la constante K es posible calcular la energía libre de Gibbs del proceso de adsorción, con la siguiente ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad \text{[Ecuación 2]}$$

Los valores de constante K a diferentes temperaturas, también permite calcular la entalpía y la entropía de adsorción, elaborando una gráfica de Van't Hoff, donde se relaciona el $\ln K$ y con el inverso de la temperatura, basada en la siguiente ecuación:

$$\ln K = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{[Ecuación 3]}$$

Donde T corresponde a la temperatura en Kelvin y R la constante de los gases ideales (8,314472 J/molK).

La caracterización de la interacción entre los materiales y ADN permite modular las propiedades de los biomateriales para optimizar su funcionalidad como vectores de transfección, por eso, estos estudios de adsorción pueden ir acompañados o pueden ser correlacionados con otros análisis fisicoquímicos y de caracterización del material, tales como el tamaño de partícula, estabilidad en disolución, porosidad, morfología o tamaño (Sahay, Alakhova & Kabanov, 2010). Por otro lado, para determinar la internalización de las nanopartículas se utilizan técnicas que pueden incluir desde estudios complejos de biología molecular hasta estudios microscópicos sencillos, tanto "ex vivo" como "in vitro" o "in vivo".

Es común el uso de genes reporteros, como enzimas o la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), para trazar o evidenciar el transporte del ADN al interior de una célula, en ensayos con cultivos celulares en los que las células son incubadas con un complejo del vehículo de transfección y un plásmido que codifique para un gen reportero (Zhu et al., 2004). En estos ensayos, las células que internalizan el vector, integran el ADN a sus procesos celulares y expresarán alguna proteína específica que puede ser cuantificada. En el caso de la GFP, su fluorescencia puede ser determinada por microscopía de fluorescencia para análisis como el que se muestra en la Figura 11 (a).

Otra metodología ampliamente utilizada para el estudio del rendimiento de transfección celular, es la citometría de flujo (Clift et al., 2008), que consiste en una técnica de análisis celular multiparamétrico, que permite el estudio del componente celular en suspensión de una manera individual (célula a célula), a través de sus características físico-químicas, así como identificar la expresión de proteínas celulares. Técnicamente se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una frente a un haz de luz focalizado, lo cual permite la cuantificación de la luz dispersada (frontal y ortogonal) y la fluorescencia emitida, como consecuencia de la excitación láser a la que es sometida. Las células con características similares forman un grupo en un gráfico que se denomina diagrama de dispersión y la fluorescencia se muestra en histogramas como el mostrado en la Figura 11 (b), cuya magnitud está relacionada con la cantidad de ADN que expresa la GFP.

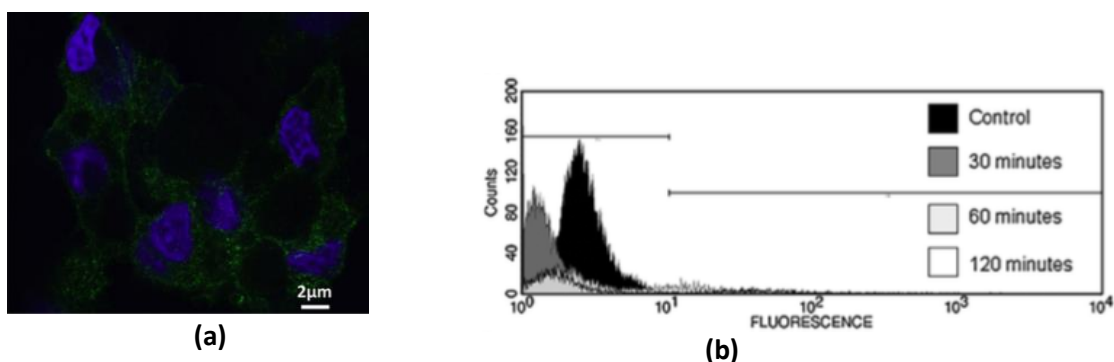


Figura 11. Métodos para cuantificar el rendimiento de transfección celular. **(a)** Micrografía de un ensayo de inmunofluorescencia (Motskin et al., 2011), **(b)** Histograma de fluorescencia de citometría de flujo (Clift et al., 2008).

Hipótesis

Las nanopartículas de hidroxiapatita sin funcionalizar y funcionalizadas en su superficie, pueden ser buenos vehículos de transfección génica. Además, la interacción con el ADN y el efecto sobre la actividad de células del sistema inmune, difieren según la funcionalización superficial de las nanopartículas.

Objetivo general

Generar evidencia sobre la utilidad de nanopartículas de hidroxiapatita, funcionalizadas y no funcionalizadas superficialmente, en aplicaciones biomédicas, mediante la evaluación de la interacción de las nanopartículas con el ADN y las propiedades pro-inflamatorias.

Objetivos específicos

1. Determinar la citotoxicidad de las nanopartículas de hidroxiapatita.
2. Identificar los materiales que estimulan la actividad proinflamatoria.
3. Calcular los parámetros termodinámicos de la interacción entre las nanopartículas de hidroxiapatita modificadas y ADN, a través de isothermas de adsorción basadas en el modelo de Langmuir.
4. Determinar el rendimiento de la transfección en células HEK 293t, utilizando las nanopartículas de hidroxiapatita modificadas superficialmente.

Capítulo II: Materiales y métodos

Síntesis de hidroxiapatitas:

Las nanopartículas fueron sintetizadas y provistas por el equipo de la Dra. Mavis Montero del Centro de Investigaciones en Electroquímica (CELEQ) de la Universidad de Costa Rica. La metodología desarrollada por el grupo de investigación de la Dra. Montero se basa en un método electrolítico que parte de una disolución saturada de iones calcio y fosfato, en presencia de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), para obtener hidroxiapatita carbonatada nanocristalina (Montalbert-Smith & Echeverría, 2009; Montalbert-Smith et al., 2009; Montero et al., 2006).

La disolución saturada de iones calcio y fosfato con EDTA se preparó a una concentración de 0,25 mol/L de CaCl_2 , 0,15 mol/L de K_2HPO_4 y 0,25 mol/L de EDTA, con agua desionizada como disolvente, y se ajustó el pH del medio a valores de 5, 7 y 9, para obtener materiales sintetizados a distintos valores de pH. El sistema electrolítico consistió en un sistema abierto al ambiente constituido por electrodos de platino paralelos y una fuente E3644A marca Agilent Technologies que se programó a una corriente de 1,86 A y una densidad de corriente de 144 mA/cm^2 . La electrólisis se mantuvo durante 6 horas a temperatura constante y luego de este periodo, las partículas fueron aisladas por centrifugación y secadas en una desecadora al vacío. De esta manera se obtuvieron los materiales identificados como Hap-5 sintetizada a un pH de 4,96, Hap-7 a un pH de 7,53 y Hap-9 a 9,22.

Funcionalización superficial de las hidroxiapatitas:

La modificación de la superficie de las nanopartículas de hidroxiapatita fue realizado por el equipo de trabajo de la Dra. Montero, como parte de un trabajo de maestría, descrito por Rojas (Rojas et al., 2015), cuyo objetivo era la síntesis y caracterización de hidroxiapatitas con diferentes grupos funcionales en su superficie. La funcionalización se llevó a cabo utilizando las hidroxiapatitas identificadas como Hap-7 y se utilizaron como moléculas para la funcionalización el anhídrido succínico, succinimida y dihidrógenofosfato de 2-aminoetilo. La funcionalización con anhídrido succínico y succinimida se realizó mediante un sistema de reflujo bajo corriente de nitrógeno constante, con hidroxiapatita a una concentración de 10% (fracción masa volumen) utilizando

acetona como disolvente y con los compuestos orgánicos respectivos, los cuales fueron purificados previamente según el procedimiento descrito por Armarego y Chai (Armarego & Chai, 2009).

El producto obtenido se separó mediante centrifugación, fue lavado con acetona y se secó en una desecadora al vacío. En el caso de la funcionalización con 2-amino etil dihidrógeno fosfato, el reflujo se realizó durante 24 horas en medio acuoso debido a la baja solubilidad de este compuesto en medios orgánicos como acetona, etanol, 2-propanol, acetonitrilo, cloroformo, entre otros. El producto obtenido fue secado a una temperatura de 60 °C en una estufa de vacío durante 7 horas, luego se lavó con agua desionizada y se secó nuevamente en una desecadora al vacío. Los materiales modificados en su superficie mediante estos métodos, fueron identificados como Hap-suc para el caso de la funcionalización con succinimida, Hap-anhsuc para anhídrido succínico y Hap-amino para dihidrógenofosfato de 2-aminoetilo.

Preparación de las suspensiones de hidroxapatitas:

Se prepararon suspensiones de trabajo de concentración 1 mg/mL, para cada una de las Hap, utilizando como medio dispersante agua desionizada, una disolución de cloruro de sodio 0,01 mol/L o medio DMEM, según el tipo de ensayo. Para ello se colocó la mezcla de Hap y medio dispersante en un baño ultrasónico durante 30 minutos a temperatura ambiente, sin embargo, dada la rápida sedimentación de los materiales en la suspensión, se determinó que se debe agitar con un agitador mecánico durante 30 segundos, cada vez que se toma un volumen de la suspensión. Las disoluciones fueron almacenadas en refrigeración.

Espectroscopía infrarroja y potencial ζ :

La caracterización de los materiales funcionalizados a través de espectroscopía infrarroja se realizó con un espectrofotómetro de transformada de Fourier Spectrum 1000 de Perkin Elmer. Se prepararon pastillas de cada material con una porción de KBr, utilizando un molde de pastilla y una prensa hidráulica a 1600 libras de presión. En la determinación del potencial ζ se prepararon sus pensiones de 0,1 mg/L de cloruro de sodio de concentración 0,01 mol/L. Las mediciones se realizaron en el equipo Zetasizer Nano ZS90 de Malvern, con un láser 633nm de 4mW He-Ne y software 6.32.

Cultivos celulares:

Se utilizaron los linajes celulares HEK 293t (linaje inmortal derivado de células renales embrionarias humanas) y Raw 264.7 (linaje finito de macrófagos murinos), según el tipo de ensayo. Ambos se preservaron congelados a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en el medio de cultivo denominado Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, por sus siglas en inglés), suplementado con suero fetal bovino (FBS, fetal bovine serum) al 20% y con dimetilsulfóxido (DMSO) al 7,5%.

Para preparar las suspensiones de trabajo, se descongelaron las alícuotas en un baño de agua durante 2 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, luego se diluyeron a un volumen final de 50 mL, se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos y se descartó el medio con DMSO. Las células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM y se colocaron en un frasco para cultivo celular. El cultivo se mantuvo en incubadora tres días a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y atmósfera humedecida al 5% en CO_2 , y fueron monitoreados al microscopio, durante ese periodo. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia aproximada del 80%, se desprendió el cultivo de las paredes del frasco con un raspador celular y se homogeneizó con ayuda de un pipeteador y un agitador automático, hasta obtener una suspensión.

Para determinar el número de células por mililitro (cel/mL) de esta suspensión, se preparó una mezcla con una relación 1:1 de la suspensión del cultivo en DMEM y azul de tripano, se colocó en una cámara de Neubauer y se realizó el conteo de células vivas (incolores) y las células muertas (color azul). Para todos los ensayos se utilizaron únicamente suspensiones cuyo porcentaje de células muertas fuera menor al 20%. Con el número de células vivas se realizó el cálculo de la concentración y la cual se ajustó por dilución a 5×10^6 cel/mL, añadiendo el volumen de DMEM que fuera necesario. Estas disoluciones constituyen las disoluciones de trabajo y según lo requiere el tipo de ensayo, se siguen diluyendo al añadir DMEM.

Ensayo de citotoxicidad y actividad proinflamatoria:

Se probaron tres concentraciones distintas para cada tipo de Hap (0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL y 0,2 mg/mL) y se realizaron tres ensayos independientes, cada uno con tres réplicas para cada concentración de hidroxiapatita. Cada ensayo independiente permitió la determinación de ambos

ensayos: el de citotoxicidad y actividad proinflamatoria, utilizando un linaje celular Raw 246.7. La actividad proinflamatoria fue determinada a través de la producción de NO mediante una reacción de Griess (Tsikas, 2007) con sulfanilamida y N-(1-naftil) etilendiamina. La citotoxicidad se determinó como la viabilidad celular, en presencia de MTT en su forma oxidada (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Se prepararon suspensiones de 1×10^6 cel/mL en DMEM, se agregó un volumen de 100 μ L de esta suspensión en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y luego la placa se colocó en una incubadora durante 24 horas a 37°C y atmósfera humedecida al 5% en CO². Posteriormente, se agregó la suspensión de Hap y DMEM según los volúmenes indicados en el Cuadro VII, para cada una de las concentraciones, y se incubó nuevamente durante 24 horas a 37°C. Luego de este tiempo se transfirieron 100 μ L de cada pocillo a otra placa para la determinación de la actividad proinflamatoria y se reservó la placa original con los 100 μ L restantes, para determinar la citotoxicidad.

Cuadro VII. Volúmenes para preparación de los pocillos a diferentes concentraciones de Hap.

Concentración de Hap	0,05 mg/mL	0,1 mg/mL	0,2 mg/mL
Volumen de DMEM (μ L)	90	80	60
Volumen de Hap a 1 mg/mL (μ L)	10	20	40

Cabe destacar que en cada ensayo individual se preparó un blanco (únicamente compuesto por la suspensión de células y DMEM), tres controles positivos en los que se sustituye la suspensión de Hap por una disolución de lipopolisacáridos en DMEM (la concentración por pocillo fue de 1 μ g/mL de lipopolisacáridos) y tres controles negativos (sin Hap). En todos los pocillos se mantuvo el mismo volumen final. A la placa para determinación de la actividad proinflamatoria se le añadió 25 μ L de sulfanilamida por pocillo, se dejó reaccionar durante 10 minutos y se agregaron 25 μ L de N-(1-naftil) etilendiamina. La placa se llevó a centrifugación durante 10 minutos a 1400 rpm y se cuantificó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm mediante un lector de ELISA (DYNEX, MRX Revelation), sustrayendo la absorbancia a 640 nm como referencia.

A la placa original con los 100 μL restantes, se le agregó 11 μL de una disolución de MTT de 5 mg/mL (por pocillo) y se llevó a incubación durante 4 horas a 37 °C y atmósfera humedecida al 5% en CO_2 . Luego de este tiempo se centrifugó durante 10 minutos a 1200 rpm, se retiró el líquido sobrenadante y a cada pocillo se le agregó 200 μL de una disolución de HCl de concentración 0,04 mol/L, con isopropanol como disolvente. Con el HCl se disolvió el precipitado, se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm, se transfirieron 150 μL del líquido sobrenadante a una nueva placa y se leyó la absorbancia a 570 nm, mediante un lector de ELISA (DYNEX, MRX Revelation).

Preparación de las suspensiones de ADN:

Se utilizó ADN de placenta humana (Sigma Aldrich, código de producto D7011), para obtener fragmentos de ADN con tamaños comprendidos entre 300 pb (pb: pares de bases) y 3000 pb. La degradación se realizó mediante la aplicación de calor, colocando tubos de polipropileno con alícuotas de 0,5 mL de una disolución de 100 μg /mL de ADN (con NaCl 10 mmol/L como disolvente), en un calentador de bloques durante 90 minutos a 100 °C. El tamaño de los fragmentos se confirmó mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1% y una disolución de buffer TBE 1x (TBE: tris, borato, EDTA). Se aplicó un voltaje de 82 V y se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Scientific, código de producto 11581625) y GelRed (Biotium, código de producto 41003), para la tinción de ADN.

Isotermas de adsorción:

Se prepararon suspensiones de cada uno de los materiales a una concentración de 150 μg /mL, utilizando una disolución de cloruro de sodio de 0,01 mol/L, como medio dispersante. A partir de estas suspensiones y de una disolución de 500 μg /mL del ADN previamente fragmentado (fragmentos entre 400 pb y 3000 pb), así como la disolución de cloruro de sodio, se prepararon mezclas de Hap-ADN para cada material. En cada una de ellas se mantuvo una masa constante de 15 μg de Hap y diferentes concentraciones de ADN, añadiendo diferentes volúmenes de la suspensión de ADN, tal como se especifica en el Cuadro VIII.

Cuadro VIII. Preparación de las mezclas Hap-ADN para la elaboración de isotermas de adsorción.

Número de mezcla	Concentración ADN aproximada ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volumen de ADN de $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ (μL)	Volumen de NaCl (μL)	Volumen de Hap de $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ (μL)
1	3	1,0	51,0	98
2	10	3,0	49,0	98
3	20	6,0	46,0	98
4	30	9,0	43,0	98
5	40	12,0	40,0	98
6	45	13,5	38,5	98
7	50	15,0	37,0	98
8	55	16,5	35,5	98
9	60	18,0	34,0	98
10	70	21,0	31,0	98
11	80	24,0	28,0	98
12	95	28,0	24,0	98
13	110	32,5	19,5	98
14	120	35,5	16,5	98

Para la elaboración de las isotermas se determinó la cantidad de ADN adsorbido sobre el material, en cada una de las mezclas a tres diferentes temperaturas: 27°C , 37°C y 44°C . Los tubos de polipropileno con las mezclas fueron colocados en un baño de agua a las temperaturas anteriormente indicadas, durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 45000 rpm por 2 minutos y se cuantificó la concentración de ADN en el líquido sobrenadante, mediante espectrofotometría, determinando la absorbancia a 260 nm con el espectrofotómetro NanoDrop2000 (Fisher Scientific). Se realizaron tres réplicas para cada temperatura y material. A partir del cálculo de la cantidad de ADN adsorbido, se elaboraron las isotermas del modelo de Langmuir, linealizadas y no linealizadas, utilizando el software RStudio (versión 1.0.136). A partir de las isotermas del modelo linealizado se realizaron los cálculos de $Q_{\text{m}} y K$, con los que se calcularon los valores de ΔG de adsorción, para cada uno de los ensayos.

Ensayos de transfección celular:

Para estos ensayos se utilizaron placas de 24 pocillos, una suspensión de células HEK 293t a $9,0 \times 10^4$ cel/mL en DMEM al 10% en suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés), suspensiones de Hap de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en DMEM con FBS al 10% y un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) (plásmido "PrecisionShuttle mammalian vector with C-terminal tGFP tag" de 6601 pb del fabricante OriGene, código de producto PS100010). En cada ensayo individual se realizaron dos réplicas por material, una réplica para determinar el rendimiento de la transfección a través de citometría de flujo y la otra réplica para su análisis a través del microscopio de fluorescencia.

Para cada material se preparó en un tubo de polipropileno de 2,5 mL, una mezcla de transfección compuesta por 25 μL del plásmido a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 1 mL de la suspensión de Hap correspondiente. Esta mezcla se homogeneizó con agitador mecánico durante 4 segundos y se dejó reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, se agregó 0,5 mL de la suspensión de células HEK 293t, se mezcló con agitador mecánico durante 4 s, se transfirieron cada una de las mezclas a la placa de 24 pocillos y se incubó durante un periodo aproximado entre 16 y 18 horas, a 37 °C y atmósfera humedecida al 5% en CO_2 .

Al concluir esta incubación, se retiró el medio sobrenadante, se agregó 0,75 mL de DMEM con FBS al 10% y se incubó nuevamente, bajo las mismas condiciones anteriores, durante un periodo de 40 a 48 horas. Posteriormente, las réplicas destinadas a su análisis bajo el microscopio son fijadas con formaldehído y las réplicas para la determinación del rendimiento de transfección son resuspendidas y analizadas en el equipo respectivo. Cabe destacar que a los pocillos correspondientes a las réplicas que fueron analizadas en el microscopio, se les colocó un portaobjetos, antes de la adición de la mezcla de transfección con los materiales y suspensión de células.

Para el análisis mediante citometría de flujo se retiró el DMEM de cada pocillo, se realizaron 2 lavados sucesivos con 0,5 mL de PBS, se resuspendieron en 50 μL de PBS y fueron analizadas en un equipo FACScalibur de 3 colores (Becton- Dickinson, USA). Primero se delimitó la población

celular que excluye fragmentos celulares y células muertas, definiendo un “gate” en el dispersograma de difracción frontal en función de la difracción lateral. Luego se construyen los histogramas de fluorescencia verde emitida por las células que se encuentran únicamente dentro de la población o “gate” anteriormente definido. Este tratamiento de datos se realiza primero con la muestra control que no fue transfectada, para determinar la posición de los eventos negativos y establecer el “gate” que se utilizará en los análisis de datos. Cabe destacar que este gate se establece de tal forma que exista un porcentaje máximo del 2%, de falsos positivos.

Respecto a la fijación con formadehído de las otras réplicas, se retiró primeramente el DMEM, se añadió 0,3 mL de formaldehído al 1,5 % en buffer de fosfatos y se dejó reposar durante 20 minutos en refrigeración. Luego se retiró el líquido sobrenadante, se sacaron los portaobjetos colocados en cada pocillo, se dejaron secar al ambiente y se utilizó el medio de montaje Fluoroshield™ with DAPI (Sigma Aldrich, código de producto F6057) para la tinción nuclear necesaria para identificar las células en los ensayos de microscopía. Los núcleos con DAPI muestran una coloración azul.

Se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus BX41 y se capturaron imágenes con la cámara DP72 de Olympus, con un objetivo de 10x y utilizando un filtro de excitación de 460 nm a 490 nm y un filtro de emisión de 510 nm (unidad espejo U-MWIB2 de Olympus). Se consideraron positivas las células que mostraron fluorescencia verde (expresión de la GFP). En cada ensayo individual, se incluyeron dos réplicas de controles positivos y negativos, manteniendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, para cada una de las técnicas mencionadas. Como control positivo se utilizó un kit comercial de fosfato de calcio (Calcium Phosphate Transfection Kit Reagent kit for stable and transient DNA transfections, Sigma–Aldrich, código de producto CAPHOS) y polietilenimina (PEI). Como control negativo se preparó un pocillo en las mismas condiciones de los ensayos con Hap, sustituyendo la suspensión de Hap por 1 mL de DMEM con FBS al 10%.

Tratamiento estadístico de los datos

Para la realización de todos los cálculos y análisis estadísticos se utilizó el software RStudio (versión 1.0.136). La significancia estadística entre muestras y controles fueron realizados a través de análisis de varianza (ANOVA) y en el caso de que se obtuviera un resultado significativo, también

se realizó una análisis *post-hoc* por el método de Tukey, con un nivel de confianza global del 95%. Los valores reportados corresponden al valor promedio \pm desviación estándar. En las isothermas de adsorción se definieron como valores atípicos aquellos que mostraron una desviación mayor o igual a tres desviaciones estándar y para todos los casos, el número de estos valores fue menor al 10% del total de los datos.

Capítulo III: Resultados y discusión de resultados

Caracterización de las nanopartículas de hidroxiapatita en suspensión

Antes de la caracterización o estudio de las nanopartículas, se realizó la verificación de la presencia de los grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas Hap-suc, Hap-anhsuc y Hap-amino, a través de espectroscopía infrarroja (FT-IR). A través de espectros como el de la Figura 12, se identificaron las principales bandas de absorción, las cuales coinciden con los estudios previos realizados por Rojas (Rojas et al., 2015). En todos los espectros se observan las señales correspondientes a los grupos fosfato (1020 cm^{-1} y 870 cm^{-1}) y las señales específicas de cada funcionalización superficial, tales como la banda a 1555 cm^{-1} del carboxilato presente en Hap-anhsuc, la banda a 1700 cm^{-1} correspondiente al carbonilo de la amida presente en Hap-suc y en Hap-amino, la señal cercana a 1627 cm^{-1} relacionada con la flexión del N-H de la amina. En el Apéndice 1 y Apéndice 2 se muestran los espectros infrarrojos de Hap-suc y Hap-amino, correspondientemente.

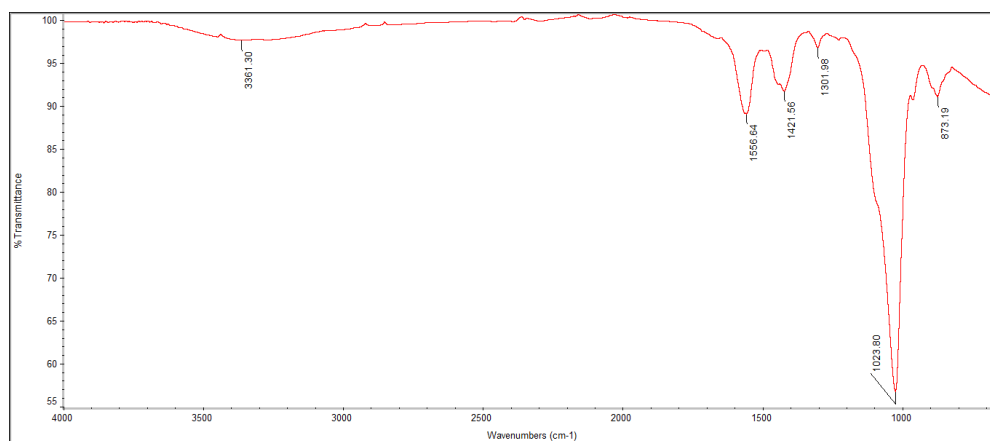


Figura 12. Espectro infrarrojo de la hidroxiapatita funcionalizada con anhídrido succínico (Hap-anhsuc).

De esta manera se deduce que los materiales presentan la misma composición de los obtenidos previamente, con la misma metodología de síntesis y funcionalización, y con ellos se preparan suspensiones en cloruro de sodio a una concentración de $0,1\text{ mol/L}$, para determinar el

tamaño de partícula y potencial ζ . En caracterizaciones previas de los materiales, se había determinado que el tamaño promedio para los materiales de estudio secos es de (32 ± 3) nm para los no funcionalizados y de (30 ± 3) nm para los funcionalizados, sin embargo, es necesario calcular el tamaño de las nanopartículas en el medio dispersante que se utilizará en los ensayos de adsorción de ADN, debido a que el tamaño puede variar según la interacción que pueda establecer el material, con los componentes del medio, que en este caso corresponden a iones sodio y cloruro, además de las moléculas de agua. A través de la medición de la luz dispersada se obtuvieron los gráficos de tamaño de la Figura 13.

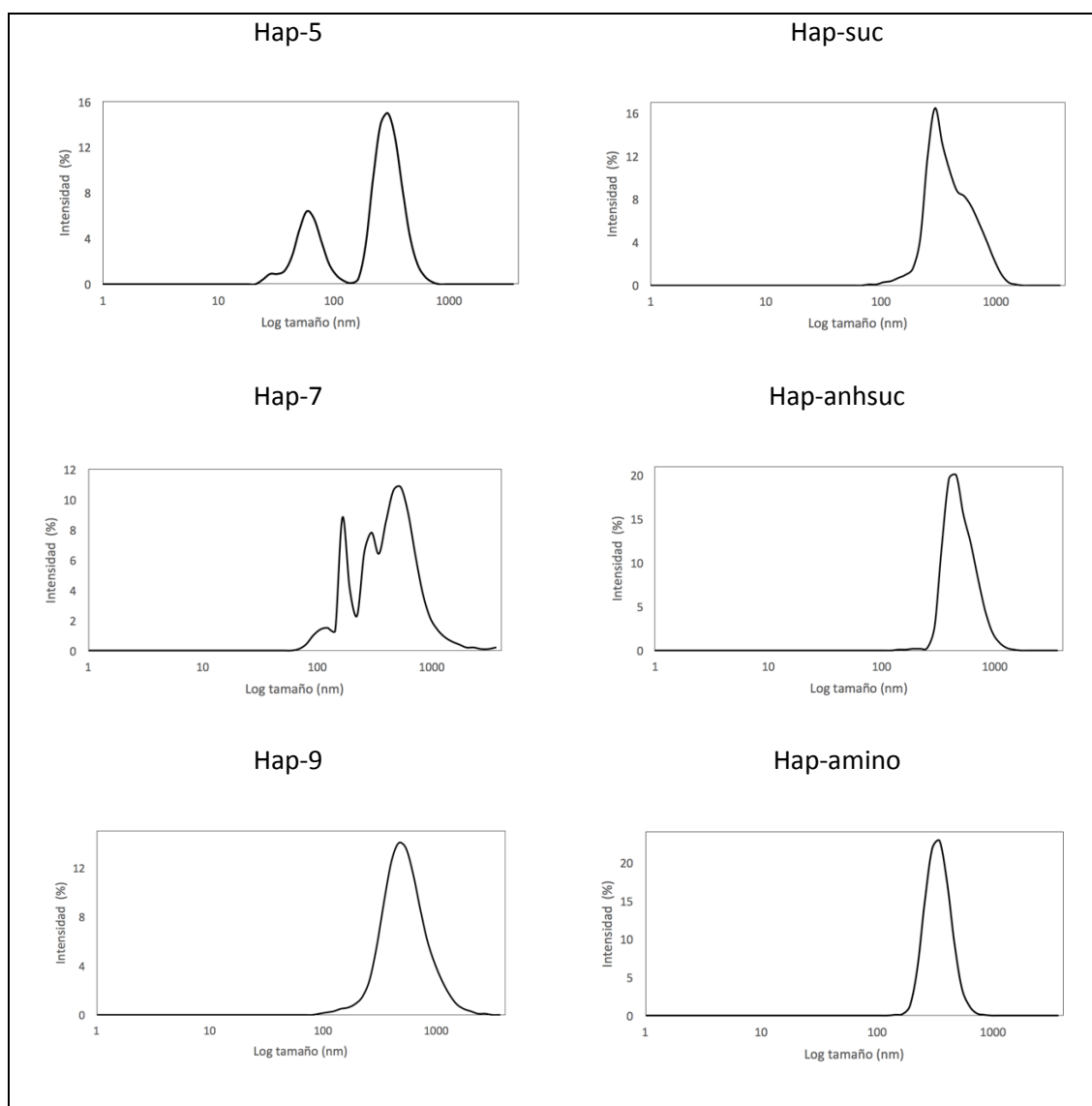


Figura 13. Gráficos del tamaño de partícula en función de la intensidad de la luz dispersada.

En estos gráficos se observó que todos los materiales en la suspensión de NaCl no presentan un único tamaño de partícula, sino que existen rangos o poblaciones de tamaño. En el caso de los materiales funcionalizados y Hap-9, se identificó un único rango de tamaño, mientras que en las suspensiones de las hidroxiapatitas sintetizadas a pH 5 y pH 7, se muestran dos o más poblaciones de tamaño. Según los resultados obtenidos, se evidencia que las suspensiones muestran una distribuciones heterogéneas de tamaño de partículas en suspensión, no sólo por la existencia de diferentes poblaciones de tamaño en un mismo material, sino por la magnitud del rango de tamaños observado. En el Cuadro IX se muestran los valores de la mediana y del rango de tamaño de cada una de las poblaciones identificadas, los cuales evidencian que todos los materiales en suspensión presentan un tamaño de partícula mayor que el del los materiales secos, lo cual sugiere la formación de aglomeraciones de los materiales, en suspensión.

Cuadro IX. Tamaño de partícula de los nanomateriales.

Material	Mediana (nm)*	Rango (nm)
Hap-5	(1) 58,77	24,4 – 141,8
	(2) 295,3	141,8 – 712,4
Hap-7	(1) 122,4	68,1 – 141,8
	(2) 164,2	141,8 – 220,2
	(3) 295,3	220,2 – 342,0
	(4) 531,2	342,0 – 2669,0
Hap-9	458,7	91,3 – 2669,0
Hap-suc	295,3	78,8 – 1484,0
Hap-anhsuc	458,7	141,8 – 1484,0
Hap-amino	342,0	141,8 – 825,0

*Los números entre paréntesis corresponden al número de la población identificada en los histogramas de tamaño.

Al comparar el tamaño de los materiales no funcionalizados, no es posible determinar una correlación entre el pH de síntesis y el tamaño promedio. Esto se debe principalmente al hecho de que tanto en Hap-5 como en Hap-7 se obtuvieron distribuciones multimodales. Sin embargo, se observó que a pH 5 se obtuvieron las nanopartículas con el menor tamaño promedio, en suspensión, lo cual podría estar relacionado con el contenido de carbonatos en el material, puesto que Hap-5 es el material con menor porcentaje de carbonatos, entre los tres materiales sin

funcionalizar. A pesar de ello, con los datos disponibles no es posible hacer una afirmación inequívoca al respecto, de hecho, no se observa una tendencia clara de variación en el tamaño al aumentar el porcentaje de carbonato. Por esta razón, la dependencia del tamaño de partícula del pH de síntesis, o del porcentaje de carbonato en el cristal debe ser analizada en estudios posteriores.

En el caso de la hidroxiapatita preparada a pH 7 (Hap-7) se observaron 4 poblaciones con base en el tamaño de partícula en la suspensión de NaCl, por esta razón, no es posible identificar claramente el efecto de la funcionalización del material sobre el tamaño medio en suspensión del material no funcionalizado, ni tampoco realizar la comparación entre las diferentes funcionalizaciones. Sin embargo, se observa que en los tres materiales funcionalizados existe una única población de tamaño de partícula y no las 4 que presenta el material a partir del cual fueron sintetizadas, lo cual sugiere la existencia de una diferencia en la interacción entre la superficie de los materiales funcionalizados y Hap-7 (sin funcionalizar), que interviene en la forma que los materiales forman agregados en la suspensión de ADN.

Con el fin de obtener más información sobre la estabilidad de las suspensiones, se determinó el potencial ζ de cada una de ellas. La literatura reporta que potenciales ζ mayores a +30 mV o menores a -30 mV están relacionados con suspensiones estables, debido a que las interacciones de repulsión entre partículas a valores altos de potencial ζ , evita la agregación de las nanopartículas (Motskin et al., 2009). Según este criterio y los datos mostrados en el Cuadro X para potencial ζ y la desviación de la medición, todas las suspensiones podrían mostrar una estabilidad satisfactoria, a valores de pH muy cercanos a los compatibles con la vida (pH entre 6,8 y 7,7). Sin embargo, no se tienen evidencias cuantitativas adicionales de la estabilidad de la suspensión, pero sí se determina que las suspensiones se sedimentaron más lentamente al ser homogeneizadas con una sonda ultrasónica que al utilizar un agitador mecánico.

Cuadro X. Potencial ζ de las nanopartículas de hidroxiapatita, determinado en suspensiones de 0,1 mg/mL (n=10).

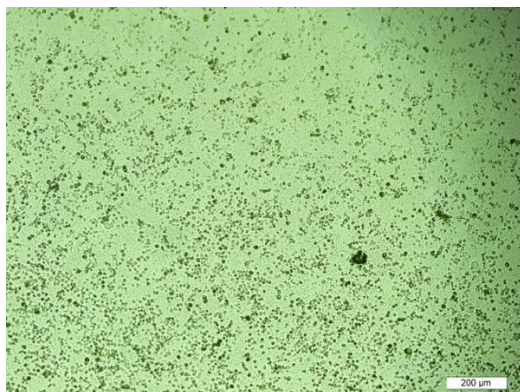
Material	Potencial ζ (mV)	Desviación (\pm mV)	pH (\pm 0,02)
Hap-5	-31,6	5,6	6,74
Hap-7	-25,0	4,2	6,83
Hap-9	-27,9	6,6	6,92
Hap-suc	-27,7	5,1	6,96
Hap-anhsuc	-28,0	8,4	6,80
Hap-amino	-28,9	4,9	6,87

Cabe destacar que todos los materiales muestran un potencial ζ negativo, cuya magnitud es similar, independientemente del tipo de funcionalización, o del pH al que se prepararon las partículas. Además, los valores de potencial ζ de los materiales funcionalizados y Hap-7 suspendidos en NaCl, son menores a los potenciales ζ reportados por Rojas (Rojas et al., 2015) para los mismos materiales, en suspensiones preparadas en PBS (buffer de fosfatos) y a pH 7, lo cual sugiere que las suspensiones de estos materiales pueden mostrar una mayor estabilidad en NaCl a una concentración de 0,01 mol/L, que en PBS. También se determinó que los valores obtenidos en los materiales funcionalizados son similares a los reportados para hidroxiapatitas funcionalizadas con ácido dodecanodíico (-28,3 mV \pm 3,9 mV) (Chen et al., 2011) y que los potenciales de los materiales no funcionalizados son mayores a los reportados para hidroxiapatitas sin funcionalizar, en suspensiones del material en KNO₃ a pH 7 (-9,59 mV \pm 0,81 mV) (Motskin et al., 2009).

Para determinar si los materiales forman agregados bajo las condiciones de los ensayos con cultivos celulares a realizar en este estudio, se realizó un ensayo en el que se incubaron los materiales funcionalizados y Hap-7 con el cultivo de las células de Raw 264.7, a tres niveles de concentración: 0,05 mg/mL, 0,10 mg/mL y 0,20 mg/mL. En la Figura 14 se resumen las observaciones realizadas en un microscopio de luz para los materiales a una concentración de 0,10 mg/mL, donde las nanopartículas de los materiales se observan como puntos oscuros, distribuidos en el cultivo celular.

Al analizar estos resultados y los incluidos en el Apéndice 3, que corresponden a las observaciones realizadas a concentraciones de 0,05 mg/mL y 0,20 mg/mL, no se observaron diferencias entre las tres concentraciones del material y no se evidenció la formación de agregados de gran tamaño, en medio del cultivo celular. Cabe destacar que se observó una heterogeneidad en el tamaño de las partículas de los nanomateriales de estudio, y que la presencia de estos no inducen alteraciones en la apariencia de los cultivos celulares, puesto que al comparar el control

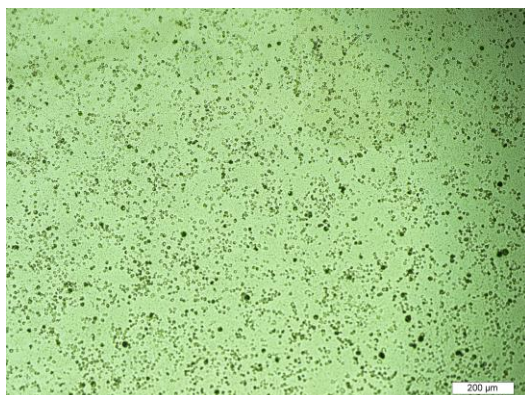
negativo (compuesto sólo por células Raw 264.7) y los cultivos incubados con los materiales tanto funcionalizados, como no funcionalizados.



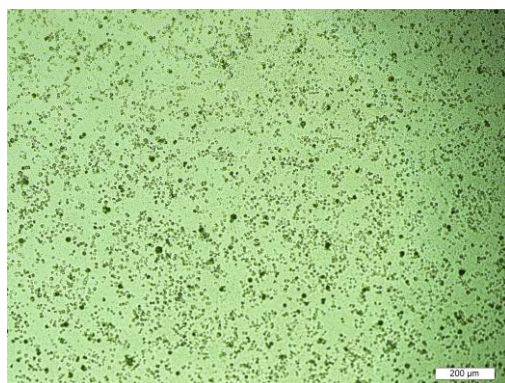
a) Hap-7



b) Hap-suc



c) Hap-anhsuc



d) Hap-amino

Figura 14. Micrografías del cultivo celular RAW 264.7, incubados con las nanopartículas de hidroxiapatita, a una concentración de 0,10 mg/mL. (Aumento 10X, la escala en el margen inferior derecho corresponde a 200 µm).

Citotoxicidad e inmunogenicidad de los materiales

Los resultados de la prueba de citotoxicidad utilizando MTT, se graficaron como se muestra en la Figura 15 para Hap-suc, donde se relaciona la viabilidad celular (interpretada como la relación entre la absorbancia de cada condición o ensayo y la absorbancia del control negativo), con la concentración del material (0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL y 0,2 mg/mL). En el Apéndice 4 y Apéndice 5 se muestran todos los gráficos para cada material y el resumen de estos resultados individuales se presenta en el gráfico de la Figura 16. En este gráfico se observa que, para todos los materiales los valores promedio son menores al control negativo, es decir, que se observa una tendencia a disminuir la viabilidad celular. Para determinar si la diferencia con respecto al control negativo es significativa, se realizó la prueba estadística de Tukey, con la cual se comparan entre sí los valores promedio de las condiciones y entre los valores del control negativo.

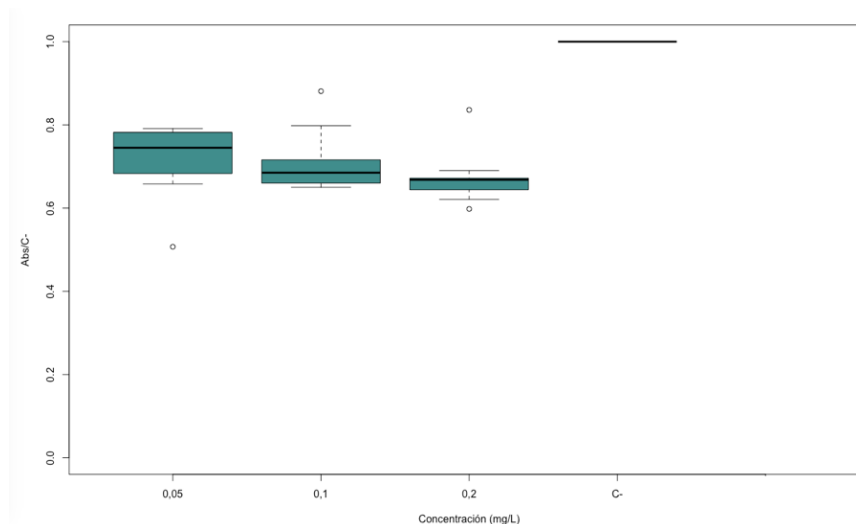


Figura 15. Efecto de Hap-suc en la viabilidad celular de células Raw 264.7, a diferentes concentraciones (n=9).

En el el Apéndice 4 y Apéndice 5 se muestran los resultados de la prueba estadística de Tukey, con la cual se determinó que no existen diferencias significativas entre los valores promedio de las diferentes condiciones y el control negativo, para todos los materiales. Sin embargo, se observa una tendencia a la disminución de la viabilidad celular con los materiales, Hap-suc y Hap-anhsuc. Esta prueba estadística también permitió identificar la ausencia de una relación directa entre la concentración de las hidroxiapatitas y la toxicidad, en el rango de concentraciones

estudiadas, ya que no hay diferencias significativas entre los valores promedio para cada concentración.

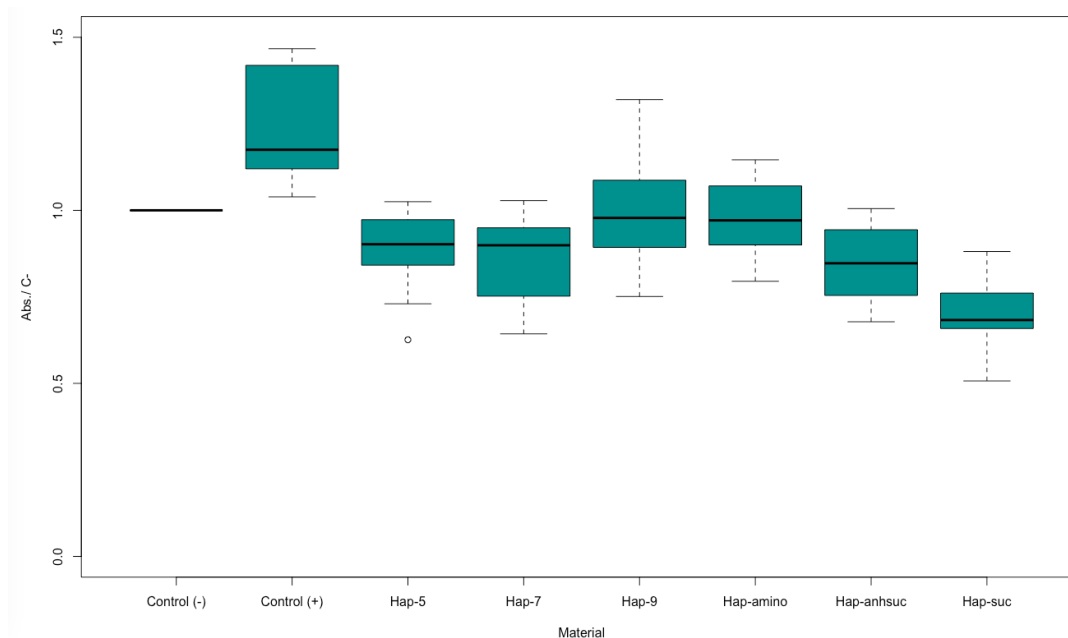


Figura 16. Efecto de las nanopartículas de hidroxiapatita en la viabilidad celular (n=9).

De manera similar, se graficaron los resultados del estudio de la producción de NO en el cultivo celular Raw 246.7 en presencia de los materiales a diferentes concentraciones, en los cuales, la producción de NO se interpreta como la relación entre la absorbancia de cada ensayo o condición y la absorbancia del control positivo. En el Apéndice 6 y Apéndice 7 se incluyen todos los resultados individuales, obtenido con esta prueba de Griess y el resumen de los datos se muestra en el gráfico de la Figura 17. Los valores promedio para todas las hidroxiapatitas son mayores que el control negativo y menores que el control positivo.

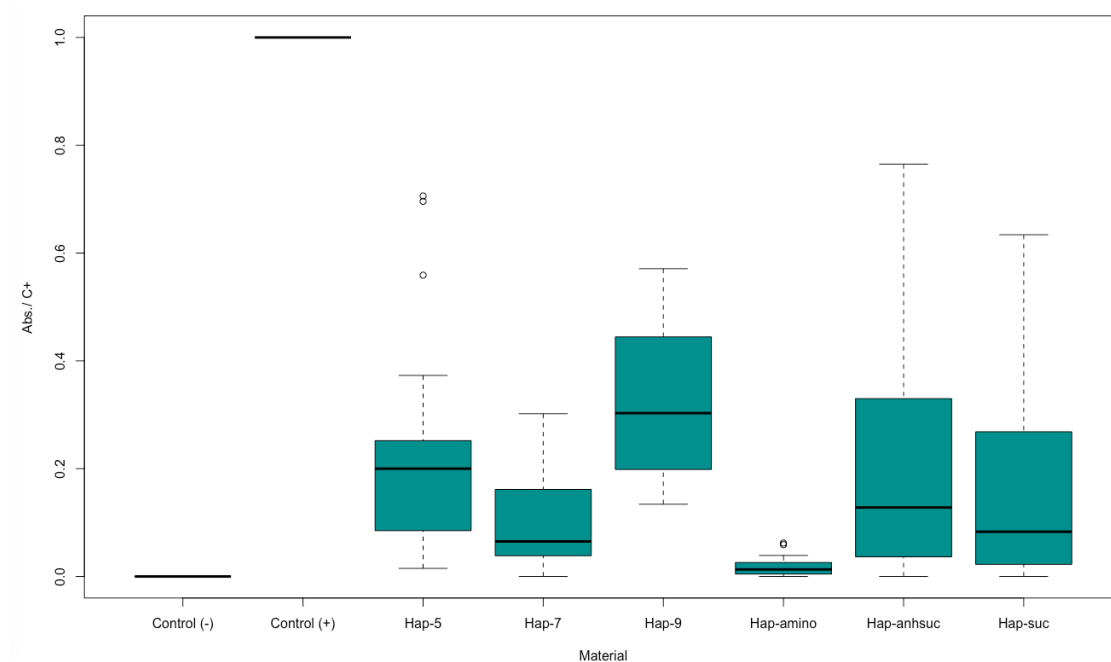


Figura 17. Efecto de las nanopartículas de hidroxapatita funcionalizadas, en la viabilidad celular y producción de NO (n=9).

Utilizando contrastes de Tukey se determinó que estas diferencias no son significativas, por lo tanto, la producción de NO determinada con los diferentes materiales, no evidencia la presencia de una actividad proinflamatoria, en las condiciones del estudio. Cabe destacar que los resultados con los materiales Hap-suc y Hap-anhsuc fueron los menos reproducibles, dentro de la colección de materiales estudiados, y que la producción de NO es menos sensible a los cambios de concentración, para los ensayos con Hap-anhsuc. Estos resultados de la prueba de Griess y de MTT permiten identificar que, bajo las condiciones de estudio, los materiales no funcionalizados no presentan una citotoxicidad ni inmunogenicidad significativas, y que estas condiciones se mantienen en los materiales funcionalizados superficialmente.

Adsorción de ADN sobre las hidroxapatitas

Para los experimentos de adsorción de ADN sobre las diferentes hidroxapatitas, se utilizó ADN de placenta humana fragmentado por tratamiento térmico y se caracterizó mediante

electroforesis, para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos, los cuales se encuentran en un rango entre 300 pb y 3000 pb, según se observa en el Apéndice 8. De esta forma se debe considerar que el sistema bajo el que se establece el proceso de adsorción, es un sistema que consta de una heterogeneidad respecto al tamaño del ADN y del material que se utilizó como adsorbente. Diferentes cantidades de este ADN fueron añadidas a la misma cantidad de hidroxiapatita, en ensayos individuales realizados a una temperatura constante, y al cuantificar la cantidad de ADN adsorbido en el material, se observó un incremento en la cantidad de masa de ADN adsorbido sobre el material, al aumentar la concentración de ADN adicionado. Con estos resultados se realizan los cálculos de q_e (gramos ADN adsorbido/gramos de Hap) relacionados con la Ecuación 1, para elaborar las isothermas de Langmuir.

En los Anexos 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se incluyen todas las gráficas construidas, tanto las isothermas de Langmuir basadas en el modelo linealizado, como no linealizado, así como los gráficos relacionados con los análisis estadísticos realizados. En la Figura 18 se muestran isothermas representativas del total de gráficos realizados, en la cual se muestra los dos comportamientos principales, observados en los resultados. Uno de ellos consiste en la obtención de isothermas con una dispersión significativa de los datos y el otro corresponde a la diferencia en la curvatura de la gráfica del modelo no linealizado, de tal forma que en algunos materiales es más evidente la saturación del material, que en otros. Ambos comportamientos se ejemplifican con los gráficos de la Figura 18, donde se observa que la isoterma de Hap-9 a 44 °C muestra una evidencia más clara de la saturación del material y una relación lineal más acorde al modelo de Langmuir, comparada con la isoterma de Hap-suc a la misma temperatura.

Al analizar el ajuste de los resultados obtenidos al modelo lineal, se observa que el coeficiente de determinación (R^2) evidencia la existencia de materiales que a ciertas temperaturas no muestran un buen ajuste al modelo de Langmuir. Tal es el caso de Hap-9 ($R^2 = 0,5786$) y Hap-7 ($R^2 = 0,5636$) a 37 °C y Hap-amino en todas las temperaturas estudiadas, siendo este, el material con mayor desvío respecto al modelo de Langmuir. Por otra parte, Hap-anhsuc es el material que más se ajusta al modelo, en el rango de temperatura estudiado ($R^2 > 0,6$). A pesar de estos resultados, de R^2 , para todos los casos se observa una tendencia lineal de los datos en el modelo linealizado y la curvatura esperada en el modelo no linealizado, sin embargo, la heterogeneidad del sistema, mencionada anteriormente, puede estar afectando la reproducibilidad de los ensayos, por

ejemplo, debido a las diferencias del área superficial relacionadas con las diferencias del tamaño de partícula o la diferencia del tamaño de los fragmentos de ADN. Otro posible factor, es la rápida sedimentación del material en las suspensiones preparadas, que puede variar la cantidad de ADN e introducir errores en la cantidad de Hap adicionada.

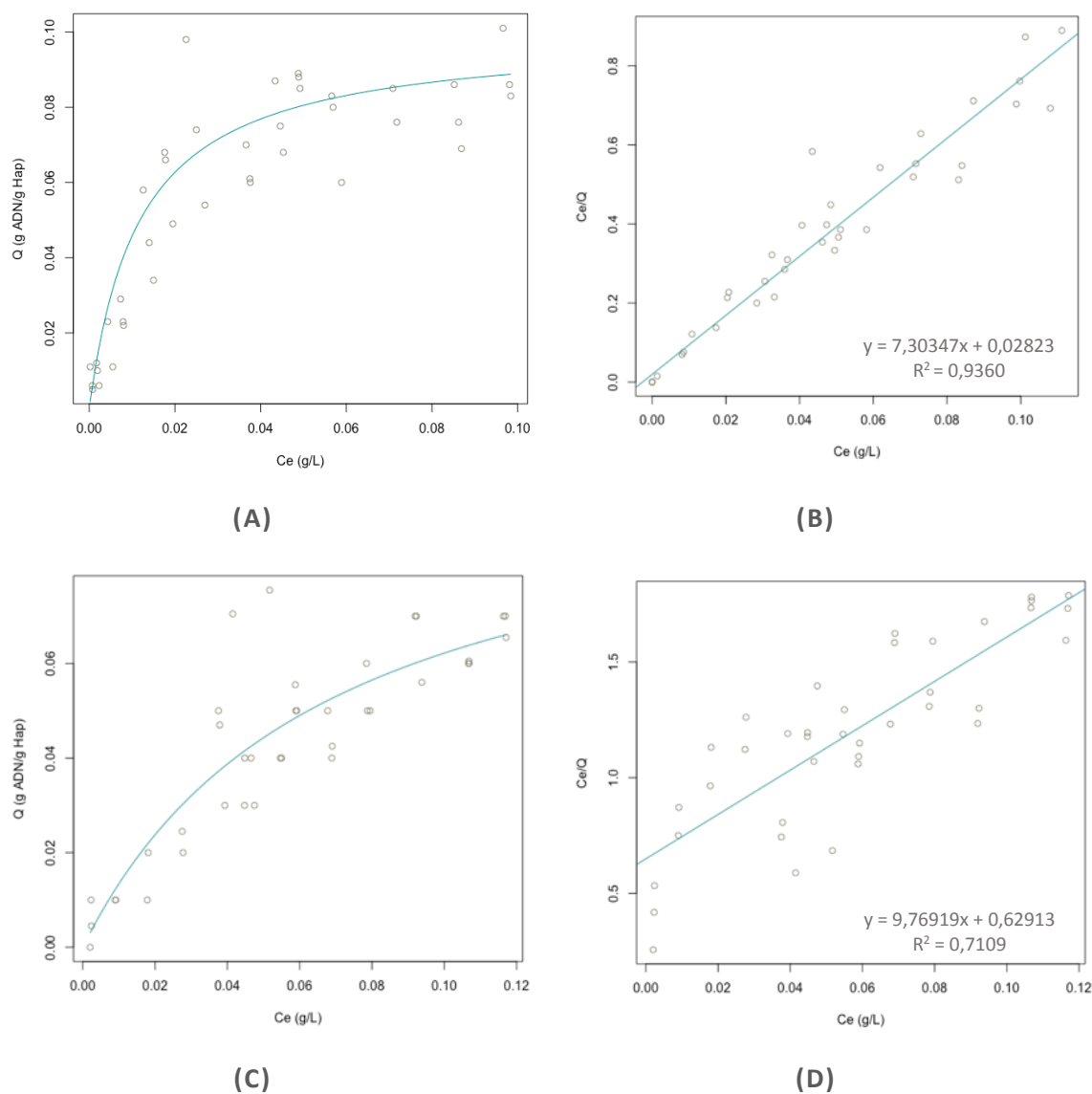


Figura 18. Ejemplos de las isothermas de Langmuir en su forma no linealizado (figuras A y C) y linealizado (figuras B y D). Las figuras A y B corresponden al material Hap-9 a 44 °C y las figuras C y D corresponden al material Hap-suc a 44 °C (n=3).

En la literatura se reportan hidroxiapatitas para las que también se evidencia el ajuste del modelo de Langmuir (Chen et al., 2007), para la adsorción entre Hap y distintos tipos de ADN, en cloruro de sodio (0,03 mol/L y 0,12 mol/L) y a temperatura de 25 °C. Sin embargo, se reportan diferencias en las isotermas de adsorción de ADN sobre hidroxiapatita, dependiendo del tamaño y otras características del ADN (Chen et al., 2007), de tal forma que existen condiciones donde el ajuste no es tan bueno, como en otros. Cabe destacar que no se tiene evidencia de la intervención de otros factores que puedan estar alterando el proceso de adsorción de tal forma que ya no aplique el modelo de Langmuir, sin embargo, se debe considerar que, ante las diferentes interacciones que puede establecer Hap con el ADN, ya sea las atracciones entre los grupos fosfato y los iones calcio o las repulsiones entre los fosfatos e iones hidroxilo (Del Valle et al., 2014), aspectos como la temperatura, tamaño de partícula, composición del material o funcionalización superficial, podrían favorecer alguna de estas dos interacciones o crear nuevas interacciones no caracterizadas ni evidenciadas, en este estudio.

Con base en los resultados de las isotermas elaboradas, se calcularon los valores de la capacidad de adsorción máxima (Q_m) del ADN sobre los diferentes materiales y de la constante de adsorción de Langmuir (K) que se relaciona con la afinidad entre el adsorbente y el adsorbato, y se aproxima a la constante de equilibrio entre el proceso de adsorción y desorción. En el Cuadro XI se resumen los valores de Q_m y K para cada uno de los experimentos, calculados a partir de la ecuación de la recta de mejor ajuste para el modelo linealizado. El análisis de estos datos se realiza tanto para caracterizar el proceso de adsorción, como para identificar posibles tendencias o resultados que permitan esclarecer o confirmar la desviación al comportamiento del modelo de Langmuir, e identificar alguno de los efectos antes propuestos.

Cuadro XI. Valores promedio de la capacidad de adsorción máxima (Q_m) y de la constante de Langmuir (K), para cada uno de los materiales, a 27 °C, 37 °C y 44 °C (n=3).

Parámetro	Q_m (g_{ADN}/g_{Hap})			K		
	27 °C	37 °C	44 °C	27 °C	37 °C	44 °C
Hap-5	0,0953	0,0992	0,0992	11,87	85,66	34,41
Hap-7	0,1304	0,1070	0,2482	167,05	18,33	515,86
Hap-9	0,0952	0,0780	0,1340	64,49	22,99	378,32
Hap-suc	0,0902	0,2180	0,1042	60,24	185,84	14,77
Hap-anhsuc	0,2401	0,1399	0,3339	208,29	14,79	462,89
Hap-amino	0,1174	0,0729	0,1677	9,53	15,59	10,25

Los valores de Q_m se graficaron como se muestra en la Figura 19 y no se identificó una relación lineal entre la temperatura y los valores de Q_m , pero sí una tendencia en todos los materiales, excepto Hap-suc, donde los valores de Q_m máximos se obtienen a 44 °C, los valores medios a 27 °C y a 37 °C los valores mínimos. Además, excepto para Hap-suc y Hap-anhsuc, los valores de Q_m a 27 °C y 44 °C muestran una menor diferencia entre ellos, comparada con la diferencia de los valores a 37 °C. Al considerar estas tendencias y las características de los materiales, no se identifica una tendencia clara de estos comportamientos, que se cumplan para todos los materiales. Sin embargo se hallan algunas observaciones que sugieren el efecto de algunos factores al comparar los resultados entre dos o más materiales. Por ejemplo, para el material Hap-5, que presentó los menores tamaños promedio de partícula (58,77 nm), se identificó una tendencia de presentar valores pequeños de Q_m , mientras que Hap-anhsuc, uno de los materiales con mayor tamaño de partícula (458,7 nm), los valores de Q_m de mayor magnitud. Esto sugiere un efecto del área superficial del material sobre la adsorción máxima del ADN.

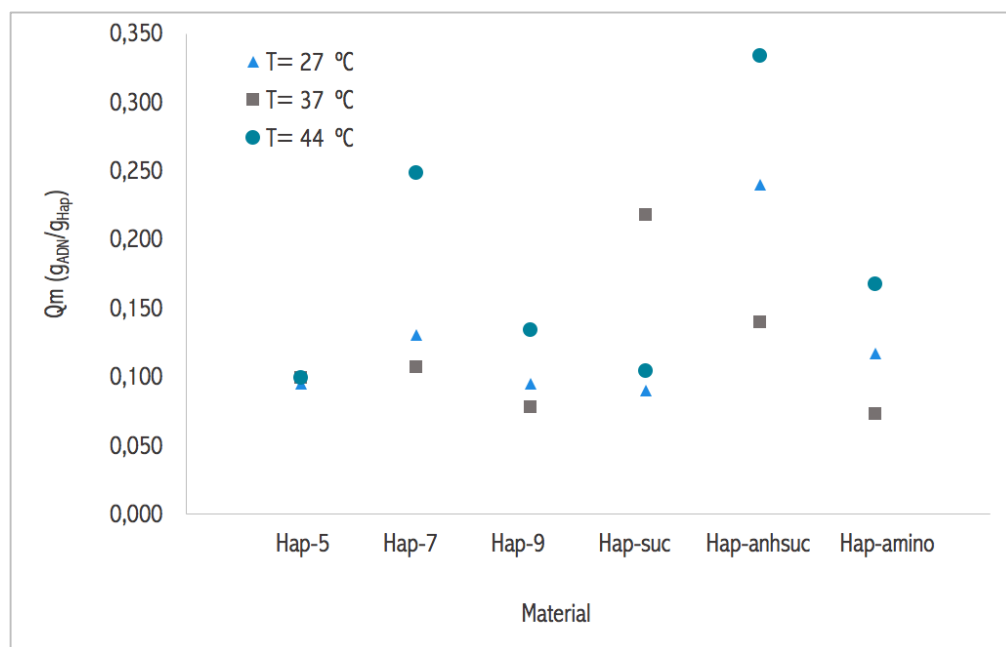


Figura 19. Gráfico de los valores de Q_m calculados, para cada material, a diferentes temperaturas.

Respecto a los materiales no funcionalizados, Hap-5 es el material cuyo Q_m es menos sensible al cambio de temperatura, dentro del rango de estudio, puesto que muestra valores con menores diferencias que los obtenidos para todos los demás materiales. Además se identifica que

a pesar de la similitud en contenido de carbonato, potencial ζ y heterogeneidad en la distribución de tamaño de partícula que presentan los materiales Hap-5 y Hap-7, estos no muestran valores o tendencias similares, tanto en los valores de Q_m como de K , lo cual sugiere la existencia de otros factores, responsables por las diferencias en la adsorción de ADN sobre los materiales. De manera similar, al comparar los valores de Q_m y K entre Hap-9 y Hap-anhsuc, no se observa una similitud entre ellos, a pesar de que presentan valores muy similares de tamaño de partícula y potencial ζ , lo que sugiere que la funcionalización superficial o la diferencia de contenido de carbonato (5,30 % en Hap-9 y 0,3% en Hap-anhsuc) pueden intervenir en las diferencias en el proceso de adsorción.

Al comparar los valores de Q_m y K entre Hap-7 y los materiales funcionalizados a partir de este material, se identifica que la funcionalización con anhídrido succínico aumenta la capacidad de adsorción máxima del material. Cabe destacar que esta tendencia no se observa en los valores de K , por lo que se infiere que la afinidad entre el ADN y el material no sólo depende de la funcionalización superficial. Cabe destacar que Hap-amino es el material con los menores valores de constante de Langmuir, en todo el rango de temperatura estudiado, lo cual sugiere que esta funcionalización disminuye la afinidad entre el material y el ADN, con respecto a Hap-7.

Para el cálculo de la entalpía y entropía de adsorción, se utilizaron los valores de K para construir los gráficos de Van't Hoff, sin embargo, para ninguno de los materiales se observó la tendencia lineal esperada en estos gráficos. Un supuesto de estos cálculos consiste en que los valores de entalpía y entropía se mantienen aproximadamente constantes en el rango de temperatura estudiado. Esto impidió el cálculo de dichos parámetros termodinámicos y por ende, la confirmación de la naturaleza endotérmica del proceso de adsorción con el ΔH_{ads} , así como la posible correlación entre la entropía del proceso de adsorción y factores como la composición, funcionalización superficial y la deshidratación de la superficie del material, durante el proceso de adsorción. Esta es una de las desventajas del uso de las isothermas de Langmuir para determinar los valores de entalpía y entropía de adsorción. Resultaría más apropiado hacer esta medición con el uso de métodos calorimétricos como la valoración calorimétrica isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés), la cual permite la cuantificación directa y más reproducible, de las entalpías de adsorción.

El comportamiento observado puede estar relacionado con los factores mencionados anteriormente para el ajuste al modelo de Langmuir, tales como la baja reproducibilidad del método, la variabilidad del tamaño de partícula del material, las posibles características variables

del ADN u otros factores que no se han determinado, que llevan al posible incumplimiento de los supuestos del modelo de Langmuir y por ende, la posibilidad de que ΔH_{ads} , no sea constante dentro del rango de temperatura estudiado. A pesar de ello, con los datos de K se calcularon las energías libres de Gibbs de adsorción, para las diferentes condiciones y materiales, y los valores obtenidos se resumen en el Cuadro XII.

Cuadro XII. Valores de energía libre de Gibbs de adsorción para cada material, a las diferentes temperaturas estudiadas.

Parámetro	ΔG_{ads} (kJ/mol)		
	27 °C	37 °C	44 °C
Hap-5	-2,68	-4,98	-4,05
Hap-7	-5,55	-3,26	-7,15
Hap-9	-4,52	-3,51	-6,80
Hap-suc	-4,44	-8,43	-3,08
Hap-anhsuc	-5,79	-3,02	-7,03
Hap-amino	-2,44	-3,08	-2,67

En coincidencia con los valores reportados en la literatura, todos los resultados muestran valores de ΔG negativos (Chen et al., 2007), lo cual indica la estabilidad y la viabilidad del proceso de adsorción entre el ADN y los diferentes materiales. Sin embargo, la magnitud del ΔG es menor a la reportada por Chen et al. (valor promedio de 32 kJ/mol), lo cual puede estar relacionado con las diferencias del ADN, de los materiales y de las condiciones del ensayo. De hecho, en este trabajo se utilizaron suspensiones en PBS (buffer de fosfatos) a una concentración mayor de NaCl (0,03 mol/L y 0,12 mol/L) y a una temperatura de 25 °C. No se identifica una variación lineal de este valor al aumentar la temperatura, sin embargo, a 37 °C se observan los valores extremos (máximos o mínimos) para cada material, en todas las hidroxiapatitas. Además, se observa que la funcionalización con dihidrógenofosfato de 2-aminoetilo, tiende a disminuir la viabilidad de la adsorción ente el material y el ADN, ya que prácticamente, presenta los mayores valores dentro del rango de temperatura de estudio.

Eficiencia de las hidroxiapatitas como vector de transfección celular

Se realizaron ensayos de transfección celular para comparar la eficiencia de Hap-7 y los materiales funcionalizados, con un kit comercial basado en la co-precipitación de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y ADN. Además de las características fisicoquímicas de las hidroxiapatitas estudiadas y los fosfatos del kit comercial, la comparación incluye un factor importante respecto a al transporte del ADN, ya que en los materiales de estudio el plásmido (pADN) que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), se encuentra adsorbido sobre la superficie del material, mientras que en el kit comercial el pADN queda incluido dentro del material particulado, es decir, coprecipita con el material y no solamente se encuentra en su superficie. Para estos ensayos se utilizó el linaje celular HEK 293t, ya que es un linaje muy estudiado y caracterizado y es un modelo en los estudios de transfección debido a la facilidad con que pueden integrar ADN foráneo y expresar proteínas recombinantes (Thomas et al., 2005).

Cabe destacar que, como parte del Trabajo Final de Graduación del estudiante Daniel Chacón titulado como “Caracterización de una colección de nanopartículas de Hidroxiapatita con diferentes propiedades estructurales como vehículos de transfección y marcadores de procesos endocíticos en diferentes linajes celulares” y dirigido por el Dr. Alfonso García Piñeres, se desarrolló y optimizó el protocolo de transfección utilizado en esta investigación y además, se determinó que el desempeño de Hap-9 en el linaje celular HEK 293t fue satisfactorio, ya que permitió obtener niveles de transfección similares a los obtenidos con el mismo kit comercial que se utilizó en esta investigación. Adicionalmente, en el trabajo de graduación mencionado se identificó que la eficiencia de transfección en los linajes Raw 264.7 y HeLa, fueron menores que los obtenidos con HEK 293t.

De esta manera, tomando como base el protocolo de transfección desarrollado y los resultados obtenidos en esta investigación previa, se realizaron los ensayos de transfección para los materiales funcionalizados y Hap-7, con el fin de determinar la eficiencia de Hap-7 como vector de transfección e identificar si la funcionalización superficial influye en el rendimiento de transfección. En los análisis realizados con citometría de flujo, se obtuvieron dispersogramas como los mostrados en la Figura 20, en los cuales se muestra la distribución de la población celular, en función de la difracción frontal (FSC-H) y lateral (SSC-H). En estos se destaca en color rojo el “gate”, que corresponde a la delimitación de la población de células que permite excluir los fragmentos celulares y células muertas. Este gate se estableció con el control negativo de cada una de las réplicas, preparado bajo las mismas condiciones de todos los ensayos pero sin adicionar ningún material. Es importante indicar que el tratamiento con los diferentes materiales no alteró la apariencia de este dispersograma, lo cual permite descartar que las diferencias observadas en

porcentaje de transfección se deba a la selección de la población celular (Figura 20).

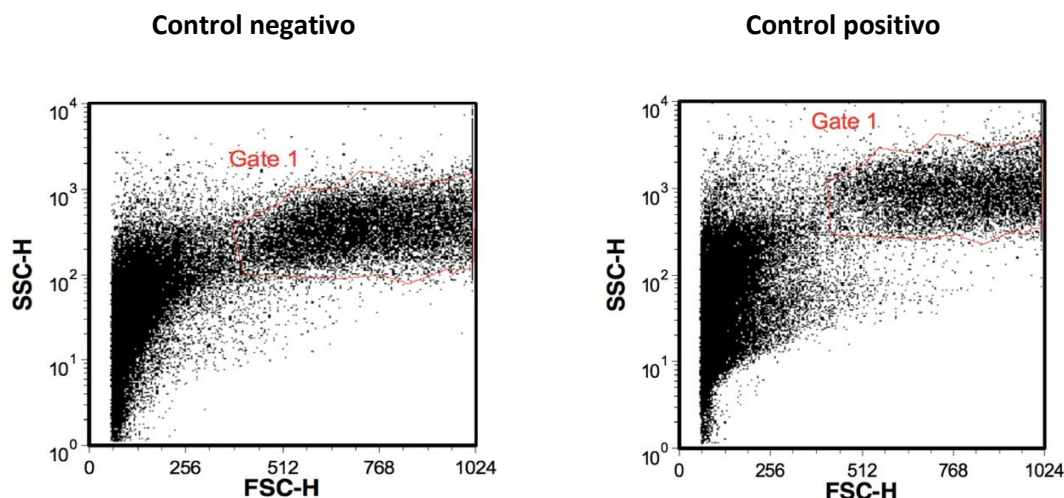


Figura 20. Dispersogramas del análisis por citometría de flujo del control positivo y negativo, de la transfección celular con plásmido codificante para GFP. (Resultados representativos de las cuatro réplicas realizadas).

Una vez delimitada la población celular, se analizaron los histogramas de fluorescencia para la proteína verde fluorescente (GFP), en los cuales se relaciona la intensidad de la fluorescencia (eje x) y la cantidad de células que emiten esta fluorescencia (eje y). En la Figura 21 se muestran histogramas representativos de los cuatro ensayos realizados. Al comparar los histogramas del control negativo y los controles positivos (ensayos donde se adicionó PEI o el kit comercial de fosfato de calcio), se evidencia la transfección celular con estos vectores, ya que el máximo de fluorescencia cambia su posición, y se observan eventos o células con mayores valores de fluorescencia, que no se observan en el control negativo. Este mismo efecto de transfección no uniforme se observa en los histogramas de los ensayos con los materiales de estudio, sin embargo, se determina un menor número de células con grandes intensidades de fluorescencia.

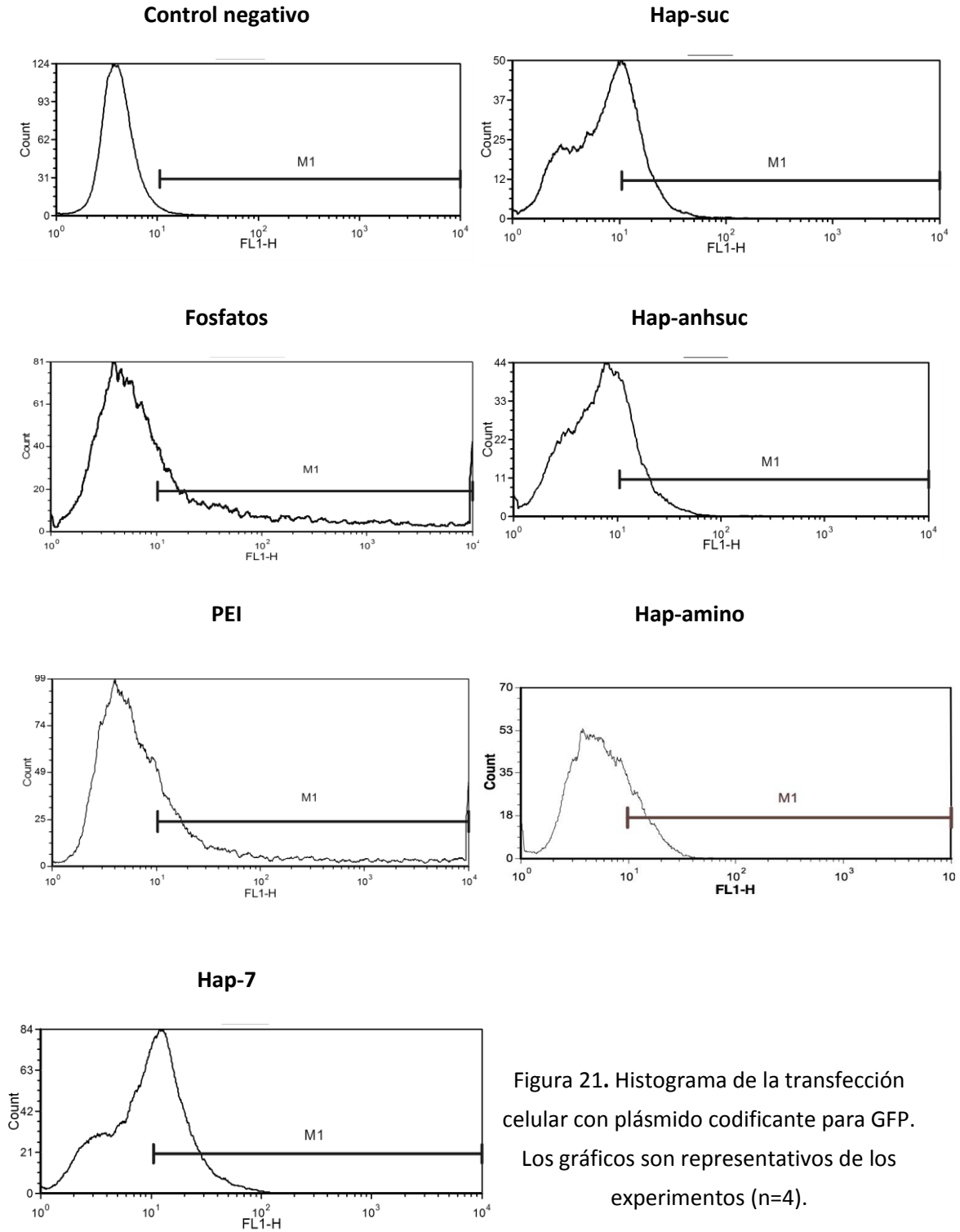


Figura 21. Histograma de la transfección celular con plásmido codificante para GFP.

Los gráficos son representativos de los experimentos (n=4).

Para cuantificar el rendimiento de la transfección de pADN con los diferentes materiales, se determinó el porcentaje de células que emiten fluorescencia, dentro del gate previamente establecido en los dispersogramas y se se decidió aceptar un valor de posibles falsos positivos de 2%, al definir un el ámbito de cuantificación (región M1) en el histograma del control negativo. La Figura 22 resume los resultados obtenidos en las cuatro réplicas realizadas y se observa que Hap-7 y todos los materiales funcionalizados muestran valores de fluorescencia mayores que el control negativo, lo cual sugiere que si hubo transfección del cultivo celular con los materiales estudiados, puesto que existen células que emiten fluorescencia, bajo el supuesto de que expresaron GFP.

La observación de un incremento en la fluorescencia luego de la transfección utilizando los diferentes materiales sugieren que sí existe una interacción entre el pADN y la superficie, funcionalizada o sin funcionalizar, de los materiales, a pesar de la existencia de diversos iones y otros solutos como aminoácidos y carbohidratos, presentes en el medio del cultivo celular, que podrían haber afectado las interacciones electrostáticas entre el material y el pADN, o bien, promover la formación de agregados. Cabe destacar que previo a los análisis de transfección celular, se realizaron ensayos de transfección donde se determinó que en ausencia de los vectores utilizados como controles positivos o de los materiales estudiados no hay una expresión de GFP en las células y que los materiales en el medio de cultivo, no muestran fluorescencia.

Los ensayos con el kit comercial de co-precipitación con fosfato de calcio muestran los valores máximos de transfección celular, comparados con el valor máximo obtenido con PEI y los materiales de estudio, mientras que los valores mínimos, entre todos los ensayos, se obtuvieron con PEI y Hap-amino. Al comparar la distribución de los datos para cada material, se determina que Hap-7 y las hidroxiapatitas funcionalizadas presentan una menor dispersión de los datos, lo cual puede sugerir una mayor reproducibilidad al utilizar estos materiales, en comparación con el uso del kit comercial y PEI, mientras que Hap-amino presenta la mayor dispersión de datos. Sin embargo, tanto con PEI como con el kit comercial se obtienen células con una expresión extremadamente alta de GFP, lo cual no se observa con las nanopartículas.

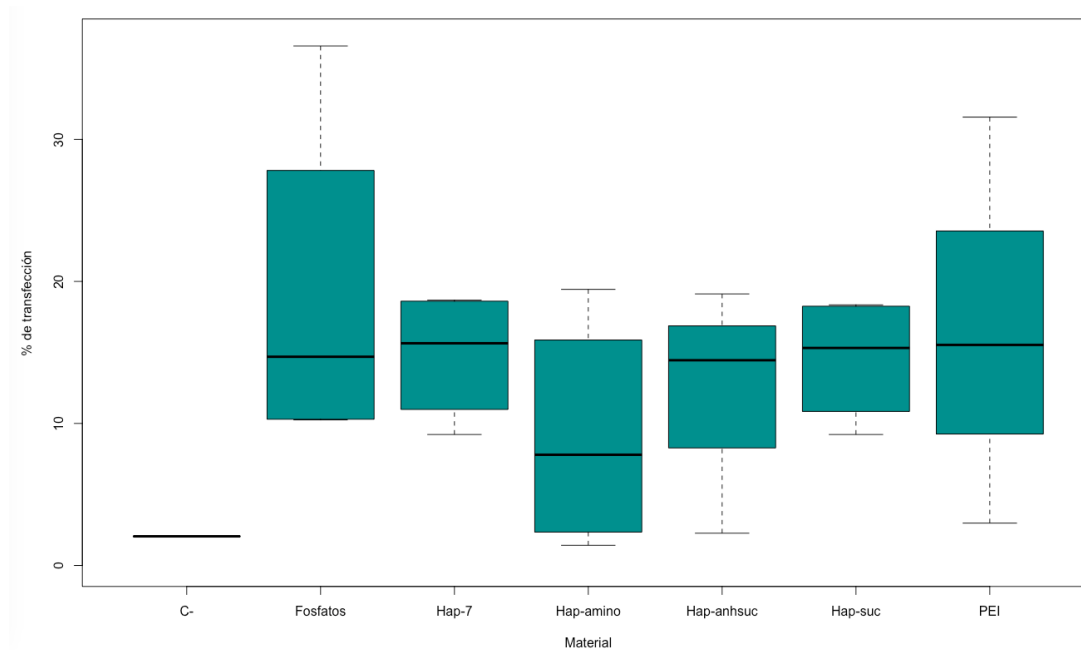


Figura 22. Rendimiento de la transfección celular en un cultivo de células HEK 293t, con los materiales funcionalizados y Hap-7, como vector de transfección de GFP (n=4).

Los valores promedio del porcentaje de transfección mostrados en el Cuadro XIII, evidencian que con Hap-7 y los materiales funcionalizados se obtienen resultados similares en los ensayos de transfección realizados, por lo cual, no se tiene evidencia de un efecto significativo de la funcionalización en la eficiencia del material como vector de transfección. Sin embargo, se observa que la transfección con Hap-amino presenta un menor rendimiento. Dentro de los factores que podrían generar esta disminución, se considera la posible interacción del grupo amino con otros elementos del medio que reducen la disponibilidad de sitios de interacción con el ADN o que alteran la interacción con este, así como, aspectos relacionados con los mecanismos de internalización del material, formación de agregados o solubilidad del material.

Como se mencionó anteriormente, con el kit de co-precipitación con fosfato de calcio se obtuvieron valores máximos de transfección mayores que con los materiales estudiados, sin embargo, los valores promedio de la transfección entre ellos no son muy distintos, de tal forma que podría no existir una desventaja en el uso de vectores de transfección donde el ADN se encuentra adsorbido superficialmente, frente a los que incluyen el ADN dentro de su estructura, formando parte del cristal precipitado, como el caso del kit comercial utilizado. De esta forma, los materiales

estudiados muestran un potencial y viabilidad en su uso como vectores de transfección celular, sin embargo se requiere una mejor caracterización del material y su interacción con los sistemas de internalización celular u otros mecanismos que no se incluyen en este trabajo, los cuales pueden brindar información de interés, para la síntesis de materiales con características optimizadas, para su uso como vectores de transfección génica.

Cuadro XIII. Rendimiento de transfección del plásmido codificante para GFP en el linaje celular HEK 293t, utilizando co-precipitación alcalina con fosfatos, polietilenimina (PEI) y nanopartículas de hidroxiapatita.

Material	Rendimiento (% transfección)*
Fosfatos	19 ± 9
PEI	17 ± 9
Hap-7	13 ± 7
Hap-suc	15 ± 4
Hap-anhsuc	13 ± 7
Hap-amino	9 ± 8

*Valores promedio ± desviación estándar (n=4)

De manera adicional, se realizaron ensayos con el microscopio de fluorescencia, para complementar los resultados obtenidos a través de citometría de flujo. Como se observa en las micrografías representativas de la Figura 23, los altos rendimientos observados en citometría de flujo para los controles positivos y el control negativo, son consistentes con lo observado en sus micrografías, donde se observa un gran número de células de color verde con los controles positivos, la ausencia de células que expresan fluorescencia, en el control negativo. Por el contrario, a través de estos ensayos no fue posible observar con facilidad células que emitieran una fluorescencia capaz de ser identificada con el microscopio.

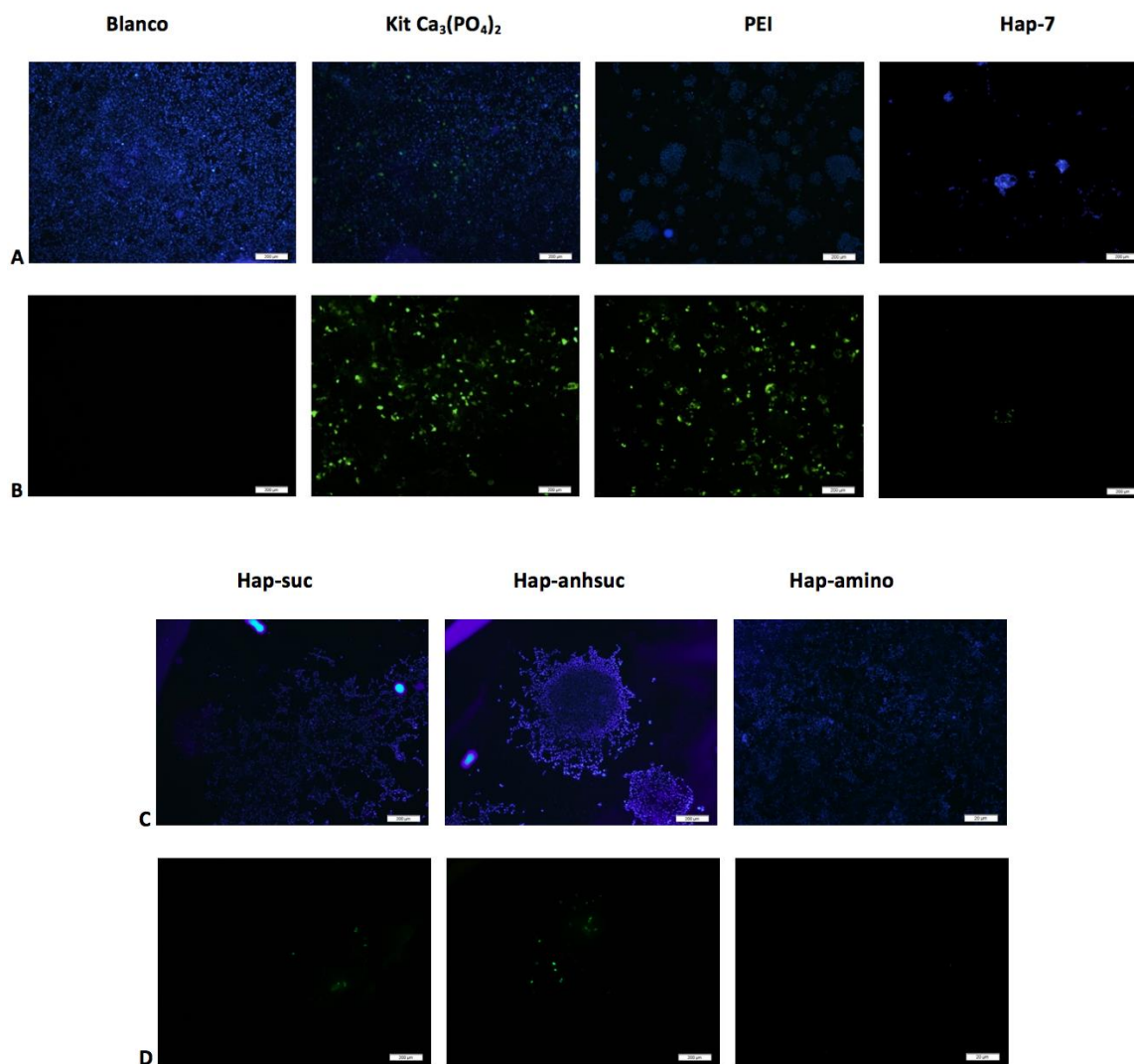


Figura 23. Comparación de la transfección celular con plásmido codificante para GFP, mediante polietilenimina (PEI), co-precipitación alcalina con fosfatos y nanopartículas de hidroxiapatita. La línea A y C corresponden a las imágenes de epifluorescencia que muestran los núcleos en azul (DAPI) y las líneas B y D la imágenes de epifluorescencia de las células que expresan GFP (n=4).

De acuerdo con los resultados observados en los histogramas de fluorescencia del estudio con citometría de flujo, las células transfectadas con Hap-7 y los matriales funcionalizados muestran una fluorescencia de baja intensidad, o al menos, menores que las observadas en los controles positivos. Por ende, existe la posibilidad de que las células transfectadas muestren una intensidad de fluorescencia no detectada a través del microscopio utilizado. Sin embargo, sí fue posible observar algunas células que expresaron la fluorescencia verde, excepto en Hap-amino. Cabe

destacar que previo a estos ensayos, se realizaron pruebas bajo las mismas condiciones de transfección, sin adicionar el pADN y se evidenció que Hap-7 y los materiales funcionalizados no presentaron fluorescencia por sí mismos.

Capítulo IV: Conclusiones

- A través de la investigación realizada se determinó que las hidroxiapatitas sintetizadas a diferentes valores de pH no se consideran materiales citotóxicos ni inmunogénicos, y que las funcionalizaciones superficiales, realizadas en Hap-7, no alteran estas características del material.
- Todos los materiales preparados en una suspensión con NaCl (0,01 mol/L) presentan valores negativos de potencial ζ menores a los reportados en PBS, con magnitudes similares entre ellos, de manera que no se identifica una relación directa entre el potencial ζ y las diferencias del contenido de carbonato en el material, ni de su funcionalización superficial.
- Los resultados de tamaño de partícula sugieren la formación de agregados del material, en una suspensión con NaCl (0,01 mol/L), y las observaciones de las suspensiones en el microscopio confirman la heterogeneidad en el tamaño de las partículas y descartan la formación de agregados de gran tamaño.
- En el proceso de adsorción entre las hidroxiapatitas estudiadas y ADN de tamaño entre 300 pb y 3000 pb, todos los materiales mostraron una tendencia al ajuste del modelo de adsorción de Langmuir, sin embargo, muestran diferencias en la exactitud con la que se ajustan a dicho modelo.
- Los valores de capacidad máxima de adsorción de los materiales no presentan una relación lineal, respecto a la temperatura.
- El material Hap-5 es el menos sensible a los cambios de temperatura y la heterogeneidad del tamaño de partícula y de ADN, en el proceso de adsorción estudiado, ya que muestra valores de Q_m muy similares, a las diferentes condiciones probadas.
- El material Hap-anhsuc es el que mejor se ajustó al modelo de Langmuir, y mostró mayores valores de capacidad máxima de adsorción.
- La funcionalización realizada en Hap-amino no favorece el rendimiento de transfección génica, en comparación con el material a partir de cuál fue sintetizada, y las demás funcionalizaciones.
- Todos los materiales, excepto Hap-amino muestran valores de transfección promedio muy similares a los de PEI y un kit comercial de transfección génica, obteniendo resultados con una mejor reproducibilidad que estos.

- **Bibliografía:**

- Ahmadian, E., Shahi, S., Yazdani, J., Maleki Dizaj, S., & Sharifi, S. (2018). *Local treatment of the dental caries using nanomaterials. Biomedicine & Pharmacotherapy, 108, 443–447.* doi:10.1016/j.biopha.2018.09.026
- Aissa, A., Agougui, H., & Debbabi, M. (2011). Surface modification of calcium fluoro and hydroxyapatite by 1-octylphosphonic dichloride. *Applied Surface Science, 257(21), 9002–9007.* doi:10.1016/j.apsusc.2011.05.087
- Aissa, A., Debbabi, M., Gruselle, M., Thouvenot, R., Gredin, P., Traksmaa, R., & Tönsuaadu, K. (2007). Covalent modification of calcium hydroxyapatite surface by grafting phenyl phosphonate moieties. *Journal of Solid State Chemistry, 180(8), 2273–2278.* doi:10.1016/j.jssc.2007.05.016
- Allen, S. J., McKay, G., & Porter, J. F. (2004). Adsorption isotherm models for basic dye adsorption by peat in single and binary component systems. *Journal of colloid and interface science, 280(2), 322–33.* doi:10.1016/j.jcis.2004.08.078
- Armarego, W. L. F., & Chai, C. L. L. (2009). *Purification of Laboratory Chemicals* (6th ed. p. 178, 693). Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Bauer, I. W., Li, S.-P., Han, Y.-C., Yuan, L., & Yin, M.-Z. (2008). Internalization of hydroxyapatite nanoparticles in liver cancer cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 19(3), 1091–1095.* doi:10.1007/s10856-007-3124-4
- Boisseau, P., & Loubaton, B. (2011). Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique, 12(7), 620–636.* <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2011.06.001>
- Boskey, A. L. (2013). Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKey Reports, 2.* doi:10.1038/bonekey.2013.181
- Brown, P., Constantz, B. (1994). *Hydroxyapatite and Related Materials.* Boca Raton: CRC Press, p.3. <https://doi.org/10.1201/9780203751367>
- Bueno, C. Z., Oliveira, C. A., & Rangel-Yagui, C. O. (2018). *Polymeric and liposomal nanomaterials. Nanobiomaterials, 437–464.* doi:10.1016/b978-0-08-100716-7.00017-9
- Burda, C., Chen, X., Narayanan, R., & El-Sayed, M. A. (2005). *Chemistry and properties of nanocrystals of different sHapes. Chemical Reviews (Vol. 105).* <https://doi.org/10.1021/cr030063a>
- Chen, W.-Y., Lin, M.-S., Lin, P.-H., Tasi, P.-S., Chang, Y., & Yamamoto, S. (2007). Studies of the interaction mechanism between single strand and double-strand DNA with hydroxyapatite by microcalorimetry and isotherm measurements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 295(1-3), 274–283.* doi:10.1016/j.colsurfa.2006.09.013

- Chen L, Mccrate JM, Lee JC-M, Li H. 2011. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. *Nanotechnology* 22:105708.
- Chen, J., Liu, J., Deng, H., Yao, S., & Wang, Y. (2019). Regulatory synthesis and characterization of hydroxyapatite nanocrystals by a microwave-assisted hydrothermal method. *Ceramics International*. doi:10.1016/j.ceramint.2019.09.203
- Chesley, M., Kennard, R., Roozbahani, S., Kim, S. M., Kukk, K., & Mason, M. (2020). *One-step hydrothermal synthesis with in situ milling of biologically relevant hydroxyapatite*. *Materials Science and Engineering: C*, 110962. doi:10.1016/j.msec.2020.110962
- Chowdhury, E. H., Maruyama, A., Kano, A., Nagaoka, M., Kotaka, M., Hirose, S., ... Akaike, T. (2006). pH-sensing nano-crystals of carbonate apatite: Effects on intracellular delivery and release of DNA for efficient expression into mammalian cells. *Gene*, 376(1), 87–94. doi:10.1016/j.gene.2006.02.028
- Chowdhury, E. H., Maruyama, A., Kano, A., Nagaoka, M., Kotaka, M., Hirose, S., ... Akaike, T. (2006). pH-sensing nano-crystals of carbonate apatite: Effects on intracellular delivery and release of DNA for efficient expression into mammalian cells. *Gene*, 376(1), 87–94. doi:10.1016/j.gene.2006.02.028
- Chowdury, E., Akaike, T. (2007) High performance DNA nano-carriers of carbonate apatite: Multiple factors in regulation of particle synthesis and transfection efficiency. *International Journal of Nanomedicine* 2007:2(1) 101–106.
- Clift, M. J. D., Rothen-Rutishauser, B., Brown, D. M., Duffin, R., Donaldson, K., Proudfoot, L., ... Stone, V. (2008). *The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232(3), 418–427. doi:10.1016/j.taap.2008.06.009
- Cummings, L. J. (2014). *Hydroxyapatite Chromatography. Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C*, 67–83. doi:10.1016/b978-0-12-420119-4.00006-9
- Davis, M. E. (2002). Non-viral gene delivery systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(2), 128–131. doi:10.1016/s0958-1669(02)00294-x
- Del Valle, L. J., Bertran, O., Chaves, G., Revilla-López, G., Rivas, M., Casas, M. T., ... Alemán, C. (2014). *DNA adsorbed on hydroxyapatite surfaces*. *J. Mater. Chem. B*, 2(40), 6953–6966. doi:10.1039/c4tb01184h
- Dorozhkin, S. V. (2009). Calcium Orthophosphates in Nature, *Biology and Medicine. Materials*, 2(2), 399–498. doi:10.3390/ma2020399
- Dorozhkin, S. V. (2010). *Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates*. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 715–734. doi:10.1016/j.actbio.2009.10.031

- Dorozhkin, S. V. (2012). *Calcium Orthophosphates: Applications in Nature, Biology, and Medicine*. Boca Raton: CRC Press, p.4.
- Drouet, C., Bosc, F., Banu, M., Largeot, C., Combes, C., Dechambre, G., ... Rey, C. (2009). *Nanocrystalline apatites: From powders to biomaterials*. *Powder Technology*, *190*(1-2), 118–122. doi:10.1016/j.powtec.2008.04.041
- Farokhi, M., Mottaghitalab, F., Samani, S., Shokrgozar, M. A., Kundu, S. C., Reis, R. L., ... Kaplan, D. L. (2018). Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Biotechnology Advances*, *36*(1), 68–91. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.10.001
- Fihri, A., Len, C., Varma, R. S., & Solhy, A. (2017). *Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis*. *Coordination Chemistry Reviews*, *347*, 48–76. doi:10.1016/j.ccr.2017.06.009
- Foo, K. Y., & Hameed, B. H. (2010). Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal*, *156*(1), 2–10. doi:10.1016/j.cej.2009.09.013
- Giger, E. V., Puigmartí-Luis, J., Schlatter, R., Castagner, B., Dittrich, P. S., & Leroux, J.-C. (2011). Gene delivery with bisphosphonate-stabilized calcium phosphate nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, *150*(1), 87–93. doi:10.1016/j.jconrel.2010.11.012
- Guha, A., Nayar, S., & Thatoi, H. N. (2010). *Microwave irradiation enhances kinetics of the biomimetic process of hydroxyapatite nanocomposites*. *Bioinspiration & Biomimetics*, *5*(2), 024001. doi:10.1088/1748-3182/5/2/024001
- Guo, X., Yan, H., Zhao, S., Li, Z., Li, Y., & Liang, X. (2013). *Effect of calcining temperature on particle size of hydroxyapatite synthesized by solid-state reaction at room temperature*. *Advanced Powder Technology*, *24*(6), 1034–1038. doi:10.1016/j.appt.2013.03.002
- Hayashi, M., Aoshi, T., Kogai, Y., Nomi, D., Haseda, Y., Kuroda, E., ... Ishii, K. J. (2016). *Optimization of physiological properties of hydroxyapatite as a vaccine adjuvant*. *Vaccine*, *34*(3), 306–312. doi:10.1016/j.vaccine.2015.11.059
- Huang, A., Dai, H., Wu, X., Zhao, Z., & Wu, Y. (2019). *Synthesis and characterization of mesoporous hydroxyapatite powder by microemulsion technique*. *Journal of Materials Research and Technology*. doi:10.1016/j.jmrt.2019.02.025
- Holzappel, B. M., Reichert, J. C., Schantz, J.-T., Gbureck, U., Rackwitz, L., Nöth, U., ... Hutmacher, D. W. (2013). *How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*(4), 581–603. doi:10.1016/j.addr.2012.07.009
- Hossain, S., Tada, S., Akaike, T., & Chowdhury, E. H. (2010). Influences of electrolytes and glucose on formulation of carbonate apatite nanocrystals for efficient gene delivery to mammalian cells. *Analytical Biochemistry*, *397*(2), 156–161. doi:10.1016/j.ab.2009.10.019

- Hou, C.-H., Hou, S.-M., Hsueh, Y.-S., Lin, J., Wu, H.-C., & Lin, F.-H. (2009). The in vivo performance of biomagnetic hydroxyapatite nanoparticles in cancer hyperthermia therapy. *Biomaterials*, 30(23-24), 3956–60. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.020
- Kakizawa, Y., & Kataoka, K. (2002). Block Copolymer Self-Assembly into Monodisperse Nanoparticles with Hybrid Core of Antisense DNA and Calcium Phosphate. *Langmuir*, 18(12), 4539–4543. doi:10.1021/la011736s
- Kester, M., Heikal, Y., Fox, T., Sharma, A., Robertson, G. P., Morgan, T. T., Altinoğlu, E. I., et al. (2008). Calcium phosphate nanocomposite particles for in vitro imaging and encapsulated chemotherapeutic drug delivery to cancer cells. *Nano letters*, 8(12), 4116–21. doi:10.1021/nl802098g
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173–3178. doi:10.1007/s00216-010-3821-6
- Komuro, H., Sasano, T., Horiuchi, N., Yamashita, K., & Nagai, A. (2018). The effect of glucose modification of hydroxyapatite nanoparticles on gene delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. doi:10.1002/jbm.a.36523
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., & Moilanen, E. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, 4(4), 471–9.
- Laaksonen, T., Santos, H., Vihola, H., Salonen, J., Riikonen, J., Heikkilä, T., ... Hirvonen, J. (2007). Failure of MTT as a Toxicity Testing Agent for Mesoporous Silicon Microparticles. *Chemical Research in Toxicology*, 20(12), 1913–1918. doi:10.1021/tx700326b
- Lafisco, M., Varoni, E., Di Foggia, M., Pietronave, S., Fini, M., Roveri, N., Rimondini, L., et al. (2012). Conjugation of hydroxyapatite nanocrystals with human immunoglobulin G for nanomedical applications. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 90, 1–7. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.09.033
- Lee, D., Upadhye, K., & Kumta, P. N. (2012). Nano-sized calcium phosphate (CaP) carriers for non-viral gene delivery. *Materials Science and Engineering: B*, 177(3), 289–302. doi:10.1016/j.mseb.2011.11.001
- Limousin, G., Gaudet, J.-P., Charlet, L., Szenknect, S., Barthès, V., & Krimissa, M. (2007). Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry*, 22(2), 249–275. doi:10.1016/j.apgeochem.2006.09.010
- Liu, Y., Wang, T., He, F., Liu, Q., Zhang, D., Xiang, S., Su, S., Zhang, J. (2011). An efficient calcium phosphate nanoparticle-based nonviral vector for gene delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 2011:6 721–727. doi:10.2147/IJN.S17096
- Lu, G.-H., Shang, W.-T., Deng, H., Han, Z.-Y., Hu, M., Liang, X.-Y., ... Tian, J. (2019). Targeting carbon nanotubes based on IGF-1R for photothermal therapy of orthotopic pancreatic

- cancer guided by optical imaging. Biomaterials, 195, 13–22. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.12.025*
- Machado, T. R., Leite, I. S., Inada, N. M., Li, M. S., da Silva, J. S., Andrés, J., ... Longo, E. (2019). *Designing biocompatible and multicolor fluorescent hydroxyapatite nanoparticles for cell-imaging applications. Materials Today Chemistry, 100211. doi:10.1016/j.mtchem.2019.100211*
- Madia, W. J. (2006). Building the future an atom at a time: Realizing Feynman's vision. *Metallurgical and Materials Transactions A, 37(10), 2905–2918. doi:10.1007/s11661-006-0172-1*
- Martin-Loeches, I., Forster, R., & Prina-Mello, A. (2018). Intensive care medicine in 2050: nanotechnology. Emerging technologies and approaches and their impact on critical care. *Intensive Care Medicine, 44(8), 1299–1301. https://doi.org/10.1007/s00134-017-5002-y*
- Mezahi, F. Z., Oudadesse, H., Harabi, A., Lucas-Girot, A., Le Gal, Y., Chair, H., & Cathelineau, G. (2008). Dissolution kinetic and structural behaviour of natural hydroxyapatite vs. thermal treatment. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 95(1), 21–29. doi:10.1007/s10973-008-9065-4*
- Montalbert-Smith, R., Palma, C. A., Arias, J. D., & Montero, M. L. (2009). Formation of Hydroxyapatite Nanosized and other Apatites by Electrolysis Process. *Key Engineering Materials, 396-398, 579–582. doi:10.4028/www.scientific.net/kem.396-398.579*
- Montero, M. L., Sáenz, A., Rodríguez, J. G., Arenas, J., & Castaño, V. M. (2006). Electrochemical synthesis of nanosized hydroxyapatite. *Journal of Materials Science, 41(7), 2141–2144. doi:10.1007/s10853-006-5231-x*
- Morgan, T. T., Muddana, H. S., Altinoglu, E. I., Rouse, S. M., Tabaković, A., Tabouillot, T., Russin, T. J., et al. (2008). Encapsulation of organic molecules in calcium phosphate nanocomposite particles for intracellular imaging and drug delivery. *Nano letters, 8(12), 4108–15. doi:10.1021/nl8019888*
- Motskin, M., Wright, D. M., Muller, K., Kyle, N., Gard, T. G., Porter, A. E., & Skepper, J. N. (2009). *Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. Biomaterials, 30(19), 3307–3317. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.044*
- Motskin, M., Müller, K. H., Genoud, C., Monteith, A. G., & Skepper, J. N. (2011). The sequestration of hydroxyapatite nanoparticles by human monocyte-macrophages in a compartment that allows free diffusion with the extracellular environment. *Biomaterials, 32(35), 9470–9482. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.060*
- Nakayama, M. (2018). Macrophage Recognition of Crystals and Nanoparticles. *Frontiers in Immunology, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.00103*

- Nikalje, A. P. (2015). Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Medicinal Chemistry*, 5(2), 81–89. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000247>
- Nur, A., Rahmawati, A., Ilmi, N. I., Affandi, S., & Widjaja, A. (2014). *Electrochemical synthesis of nanosized hydroxyapatite by pulsed direct current method*. doi:10.1063/1.4866736
- Oliva, N., Unterman, S., Zhang, Y., Conde, J., Song, H. S., & Artzi, N. (2015). Personalizing Biomaterials for Precision Nanomedicine Considering the Local Tissue Microenvironment. *Advanced Healthcare Materials*, 4(11), 1584–1599. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400778>
- Olton, D. Y. E., Close, J. M., Sfeir, C. S., & Kumta, P. N. (2011). Intracellular trafficking pathways involved in the gene transfer of nano-structured calcium phosphate-DNA particles. *Biomaterials*, 32(30), 7662–7670. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.043
- Pighinelli, L., & Kucharska, M. (2013). Chitosan-hydroxyapatite composites. *Carbohydrate polymers*, 93(1), 256–62. doi:10.1016/j.carbpol.2012.06.004
- Pouton, C. W., & Seymour, L. W. (2001). Key issues in non-viral gene delivery. PII of original article: S0169-409X(98)00048-9. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 34 (1998) 3–19.1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 187–203. doi:10.1016/s0169-409x(00)00133-2
- Raftery, R. M., Walsh, D. P., Castaño, I. M., Heise, A., Duffy, G. P., Cryan, S.-A., & O'Brien, F. J. (2016). Delivering Nucleic-Acid Based Nanomedicines on Biomaterial Scaffolds for Orthopedic Tissue Repair: Challenges, Progress and Future Perspectives. *Advanced Materials*, 28(27), 5447–5469. doi:10.1002/adma.201505088
- Ramsden, J. J. (2018). What is Nanotechnology? *Applied Nanotechnology*, 3–13. doi:10.1016/b978-0-12-813343-9.00002-0
- Riehemann, K., Schneider, S. W., Luger, T. A., Godin, B., Ferrari, M., & Fuchs, H. (2009). Nanomedicine-Challenge and Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(5), 872–897. doi:10.1002/anie.200802585
- Rivera-Muñoz, E. (2011). Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization. *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. doi:10.5772/19123
- Rogers, B., Adams, J., & Pennathur, S. (2013). Nanomedicine. *Nanotechnology: The Whole Story* (pp. 331–348). New York: CRC Press. doi:10.1201/b13748-12
- Rojas, L., Olmedo, H., García-Piñeres, A. J., Silveira, C., Tasic, L., Fraga, F., & Montero, M. L. (2015). Simple route for nano-hydroxyapatite properties expansion. *Biomedical Materials*, 10(5), 055015. doi:10.1088/1748-6041/10/5/055015

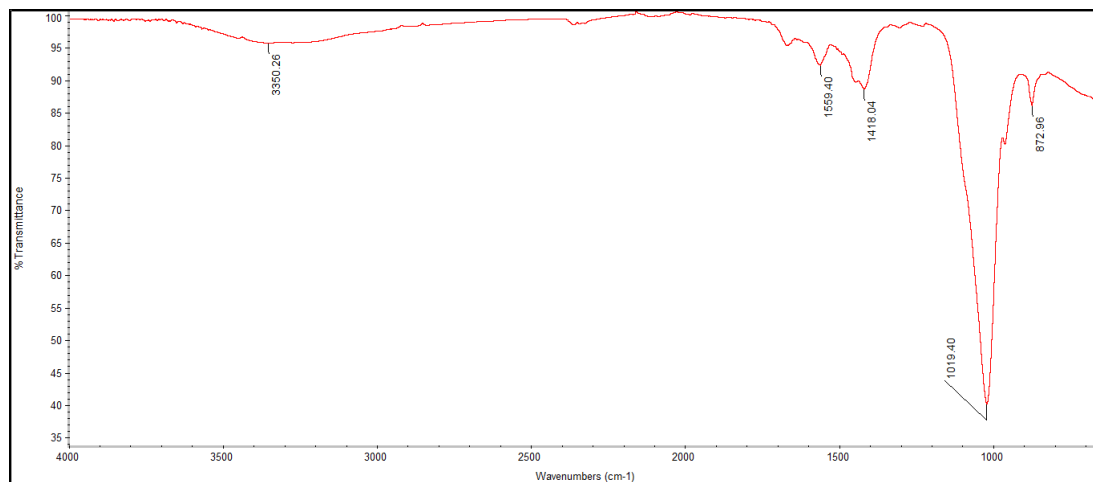
- Rouhani, P., Taghavinia, N., & Rouhani, S. (2010). Rapid growth of hydroxyapatite nanoparticles using ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(5), 853–856. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.01.010
- Sadat-Shojai, M., Khorasani, M.-T., Dinpanah-Khoshdargi, E., & Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, 9(8), 7591–7621. doi:10.1016/j.actbio.2013.04.012
- Sahay G, Alakhova DY, Kabanov A V. 2010. Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release* 145:182–95.
- Samimi, S., Maghsoudnia, N., Eftekhari, R. B., & Dorkoosh, F. (2019). Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, 47–76. doi:10.1016/b978-0-12-814031-4.00003-9
- Sebastian, T., Preisker, T. R., Gorjan, L., Graule, T., Aneziris, C. G., & Clemens, F. J. (2020). Synthesis of Hydroxyapatite Fibers Using Electrospinning: A Study of Phase Evolution Based on Polymer Matrix. *Journal of the European Ceramic Society*. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2020.01.070
- Shue, L., Yufeng, Z., & Mony, U. (2012). Biomaterials for periodontal regeneration: A review of ceramics and polymers. *Biomatter*, 2(4), 271–7. doi:10.4161/biom.22948
- Son, Y., Lee, I., Jo, H., Chung, T., Oh, Y. (2019) Setting Behavior and Drug Release from Brushite Bone Cement prepared with Granulated Hydroxyapatite and β -Tricalcium Phosphate. *Journal of the Korean Ceramic Society* 2019; 56(1): 56-64. doi.org/10.4191/kcers.2019.56.1.06
- Strand M. S., Krasnick B. A., Pan H., Zhang X., Bi Y., Brooks C., Wetzel C., Sankpal N., Fleming T., Goedegebuure S. Peter, DeNardo D. G., Gillanders W. E., Hawkins W. G. (2019) Precision delivery of RAS-inhibiting siRNA to KRAS driven cancer via peptide-based nanoparticles. *Oncotarget*. 2019; 10: 4761-4775. doi:10.18632/oncotarget.27109
- Su, X., Sun, K., Cui, F. ., & Landis, W. . (2003). Organization of apatite crystals in human woven bone. *Bone*, 32(2), 150–162. doi:10.1016/s8756-3282(02)00945-6
- Svanborg, L. M., Hoffman, M., Andersson, M., Currie, F., Kjellin, P., & Wennerberg, a. (2011). The effect of hydroxyapatite nanocrystals on early bone formation surrounding dental implants. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 40(3), 308–15. doi:10.1016/j.ijom.2010.10.010
- Szczęś, A., Hołysz, L., & Chibowski, E. (2017). Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 321–330. doi:10.1016/j.cis.2017.04.007

- Talal, a, Waheed, N., Al-Masri, M., McKay, I. J., Tanner, K. E., & Hughes, F. J. (2009). Absorption and release of protein from hydroxyapatite-poly(lactic acid) (HA-PLA) membranes. *Journal of dentistry*, 37(11), 820–6. doi:10.1016/j.jdent.2009.06.014
- Tampieri, A., D'Alessandro, T., Sandri, M., Sprio, S., Landi, E., Bertinetti, L., Panseri, S., et al. (2012). Intrinsic magnetism and hyperthermia in bioactive Fe-doped hydroxyapatite. *Acta biomaterialia*, 8(2), 843–51. doi:10.1016/j.actbio.2011.09.032
- Tanaka, H., Futaoka, M., & Hino, R. (2004). Surface modification of calcium hydroxyapatite with pyrophosphoric acid. *Journal of Colloid and Interface Science*, 269(2), 358–363. doi:10.1016/j.jcis.2003.07.039
- Tanaka, H., Tsuda, E., Nishikawa, H., & Fuji, M. (2012). FTIR studies of adsorption and photocatalytic decomposition under UV irradiation of dimethyl sulfide on calcium hydroxyapatite. *Advanced Powder Technology*, 23(1), 115–119. doi:10.1016/j.appt.2011.01.001
- Tang, Z., He, C., Tian, H., Ding, J., Hsiao, B. S., Chu, B., & Chen, X. (2016). Polymeric nanostructured materials for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 60, 86–128. doi:10.1016/j.progpolymsci.2016.05.005
- Tenkumo, T., Vanegas Sáenz, J. R., Takada, Y., Takahashi, M., Rotan, O., Sokolova, V., ... Sasaki, K. (2016). Gene transfection of human mesenchymal stem cells with a nano-hydroxyapatite-collagen scaffold containing DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles. *Genes to Cells*, 21(7), 682–695. doi:10.1111/gtc.12374
- Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3), 187–200. doi:10.1016/j.vascn.2004.08.014
- Tibbitt, M. W., & Langer, R. (2017). Living Biomaterials. *Accounts of Chemical Research*, 50(3), 508–513. doi:10.1021/acs.accounts.6b00499
- Torres-Sangiao, E., Holban, A., & Gestal, M. (2016). Advanced Nanobiomaterials: Vaccines, Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases. *Molecules*, 21(7), 867. doi:10.3390/molecules21070867
- Tsikis, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 851(1-2), 51–70. doi:10.1016/j.jchromb.2006.07.054
- Turon, P., del Valle, L., Alemán, C., & Puiggali, J. (2017). Biodegradable and Biocompatible Systems Based on Hydroxyapatite Nanoparticles. *Applied Sciences*, 7(1), 60. doi:10.3390/app7010060

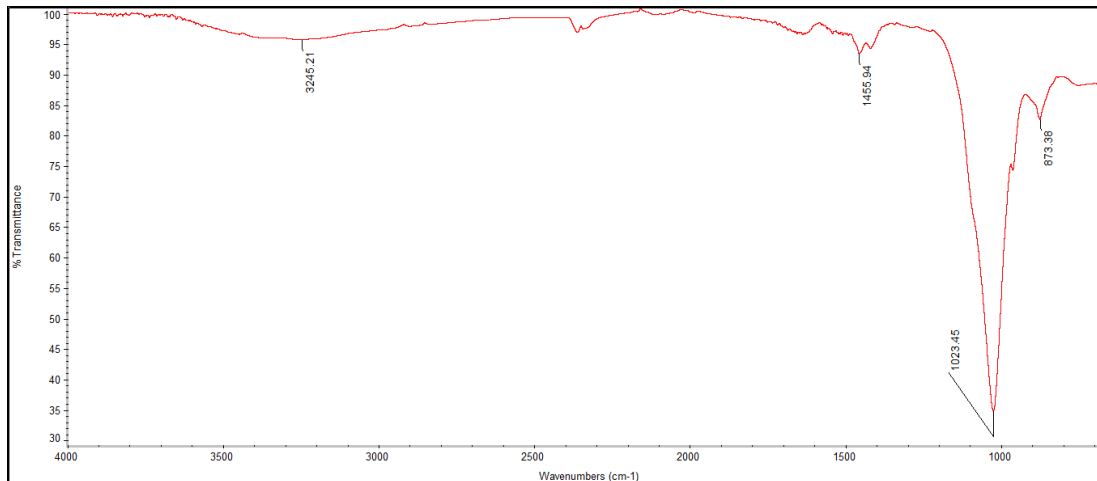
- Venkatesan, S., Hassan, M. ul, & Ryu, H. J. (2019). Adsorption and immobilization of radioactive ionic-corrosion-products using magnetic hydroxyapatite and cold-sintering for nuclear waste management applications. *Journal of Nuclear Materials*. doi:10.1016/j.jnucmat.2018.11.026
- Wang, Y., Dai, J., Zhang, Q., Xiao, Y., & Lang, M. (2010). Improved mechanical properties of hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) scaffolds by surface modification of hydroxyapatite. *Applied Surface Science*, 256(20), 6107–6112. doi:10.1016/j.apsusc.2010.03.127
- Xu, H., Jiang, Y., Wei, D., & Gai, X. (2016). Amine functionalised hydroxyapatite nanoparticles for anti-angiogenesis gene therapy of breast cancer. *Micro & Nano Letters*, 11(8), 416–419. doi:10.1049/mnl.2016.0078
- Xue, Z.-H., Dai, S.-X., Hu, B.-B., & Du, Z.-L. (2009). Effect of Langmuir monolayer of bovine serum albumin protein on the morphology of calcium carbonate. *Materials Science and Engineering: C*, 29(6), 1998–2002. doi:10.1016/j.msec.2009.03.016
- Yang, Y., & Yu, C. (2016). Advances in silica based nanoparticles for targeted cancer therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(2), 317–332. doi:10.1016/j.nano.2015.10.018
- Yuan, Y., Gu, Z., Yao, C., Luo, D., Yang, D. (2019) Nucleic Acid–Based Functional Nanomaterials as Advanced Cancer Therapeutics. *Small* 2019, 15, 1900172. doi: 10.1002/smll.201900172
- Zhang, Y., Zhu, J., Li, S., Xiao, Y., Zhan, Y., Wang, X., Jiang, L. (2020). Rational design of highly H₂O- and CO₂-tolerant hydroxyapatite-supported Pd catalyst for low-temperature methane combustion. *Chemical Engineering Journal*, 396, 125225. doi:10.1016/j.cej.2020.125225
- Zhou, H., & Lee, J. (2011). Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 7(7), 2769–2781. doi:10.1016/j.actbio.2011.03.019
- Zhu SH, Huang BY, Zhou KC, Huang SP, Liu F, Li YM, Xue ZG, Long ZG. 2004. Hydroxyapatite Nanoparticles as a Novel Gene Carrier. *J Nanoparticle Res* 6:307–311.

Apéndices

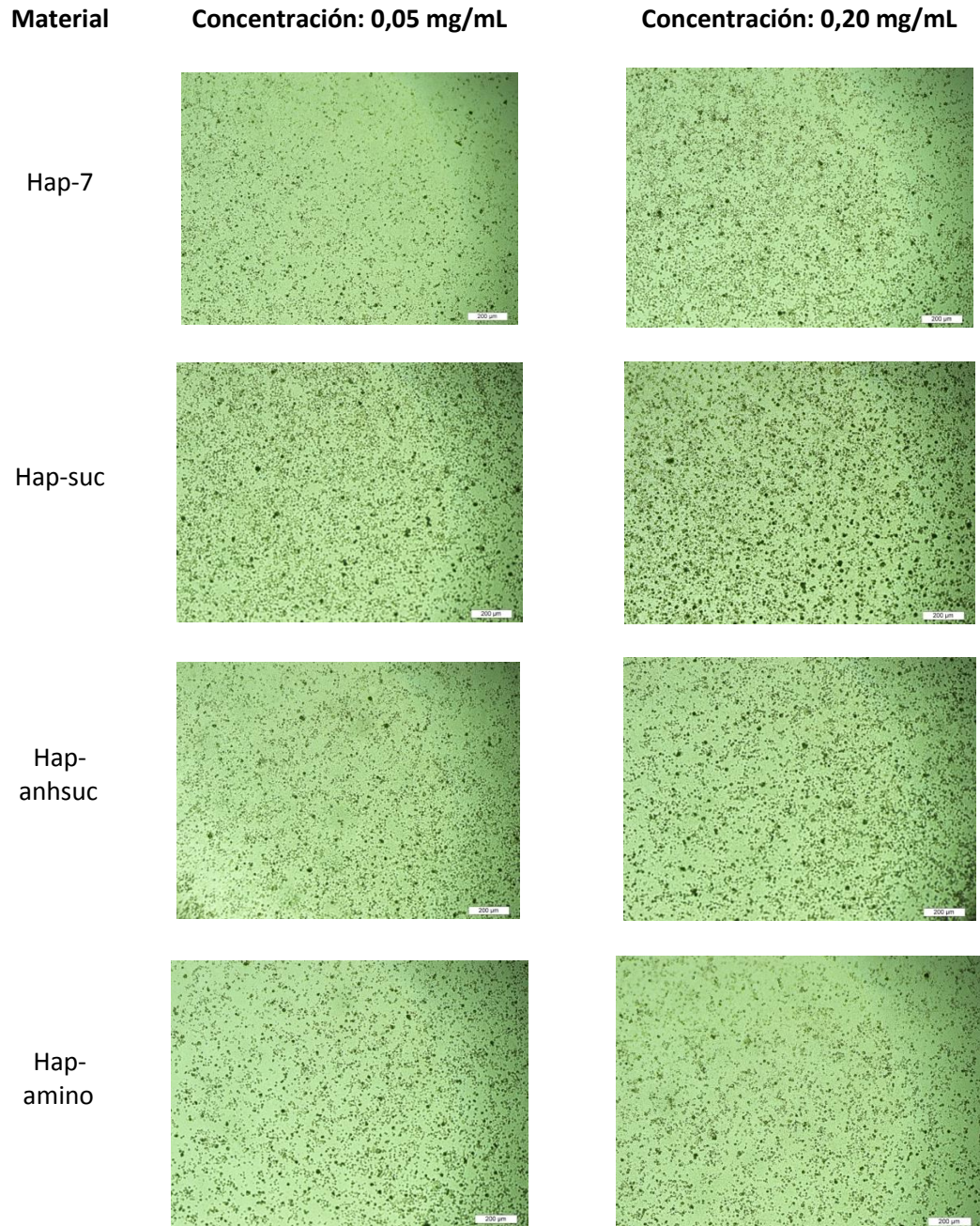
Apéndice 1. Espectro infrarrojo del material Hap-suc.



Apéndice 2. Espectro infrarrojo del material Hap-amino.



Apéndice 3. Micrografías del cultivo celular RAW 264.7, incubados con las nanopartículas de hidroxiapatita, a una concentración de 0,05 mg/mL y 0,20 mg/mL. (Aumento 10X. La escala en el margen inferior derecho corresponde a 200 μ m).



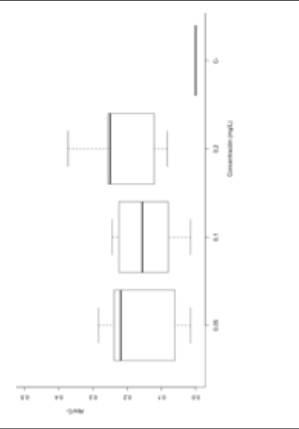
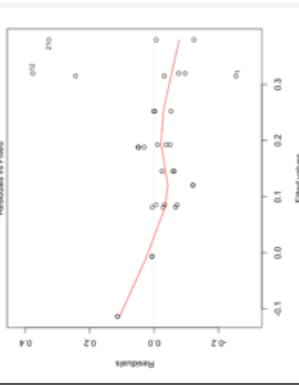
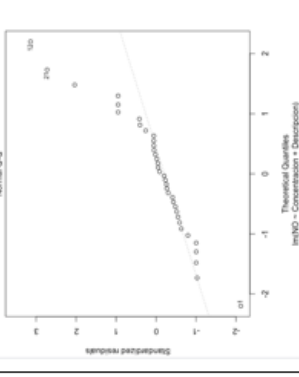
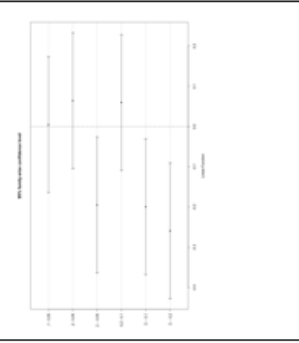
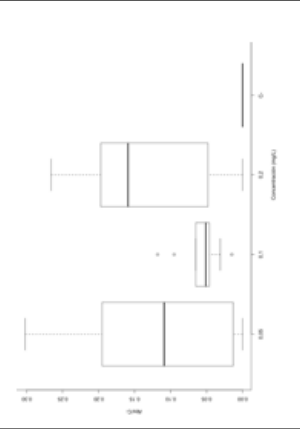
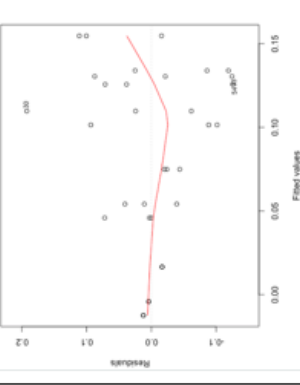
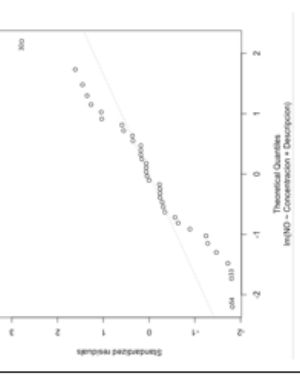
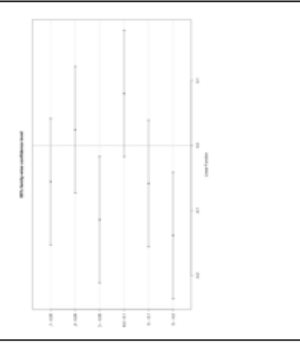
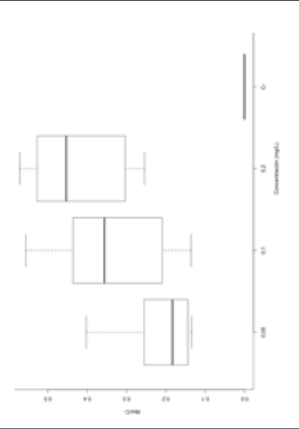
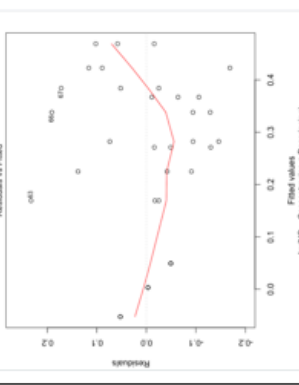
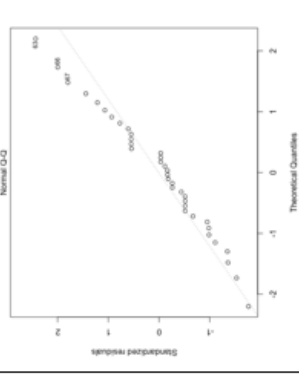
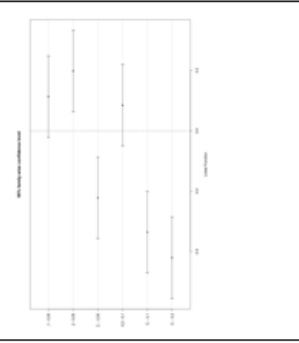
Apéndice 4. Análisis estadístico de los resultados del ensayo de citotoxicidad con MTT, para los materiales no funcionalizados.

Material	Anova	Gráfico residuales ajustados	Gráfico Q-Q	Gráfico Tukey
Hap-5				
Hap-7				
Hap-9				

Apéndice 5. Análisis estadístico de los resultados del ensayo de citotoxicidad con MTT, para los materiales funcionalizados.

Material	Anova	Gráfico residuales ajustados	Gráfico Q-Q	Gráfico Tukey
Hap-suc				
Hap-anhsuc				
Hap-amino				

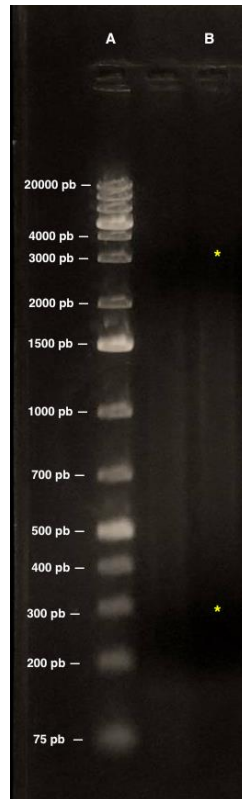
Apéndice 6. Análisis estadístico de los resultados de la producción de NO, para los materiales no funcionalizados.

Material	Anova	Gráfico residuales ajustados	Gráfico Q-Q	Gráfico Tukey
Hap-5				
Hap-7				
Hap-9				

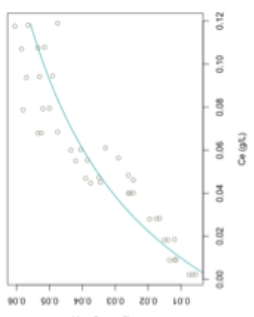
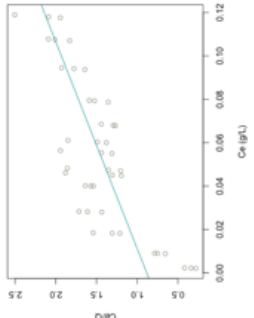
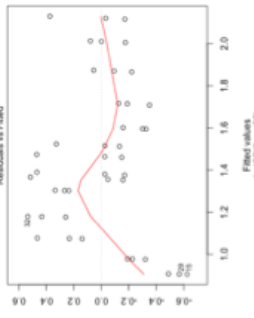
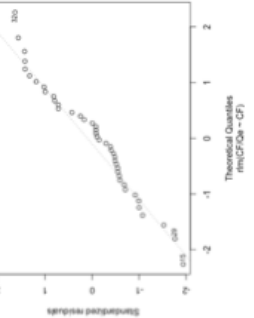
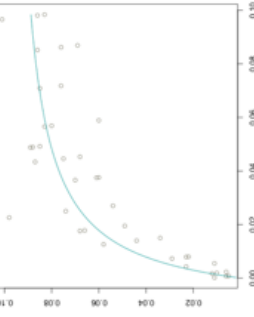
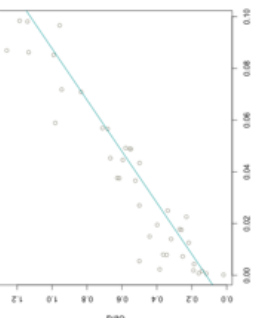
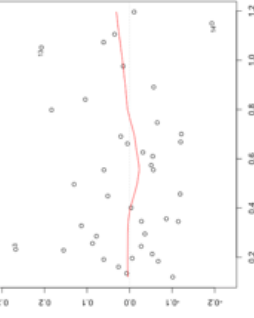
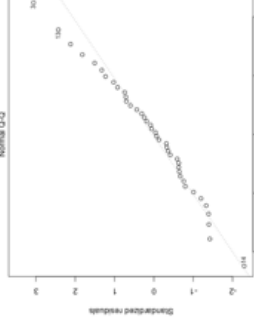
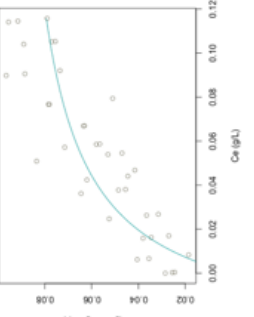
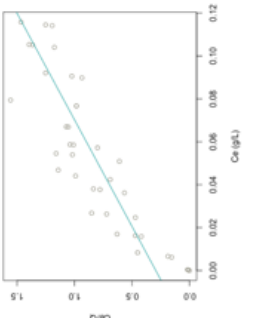
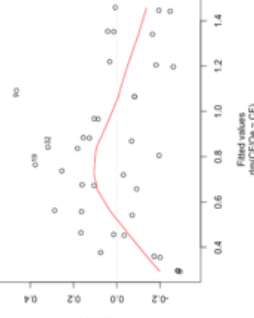
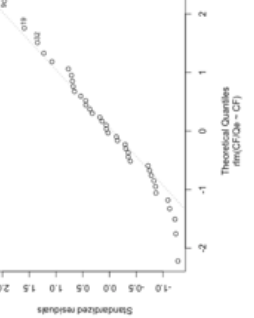
Apéndice 7. Análisis estadístico de los resultados de la producción de NO, para los materiales funcionalizados.

Material	Anova	Gráfico residuales ajustados	Gráfico Q-Q	Gráfico Tukey
Hap-Suc				
Hap-anhsuc				
Hap-amino				

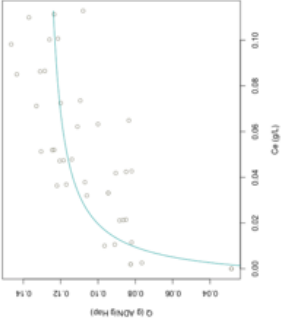
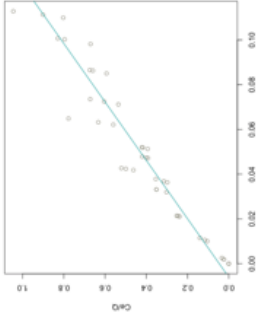
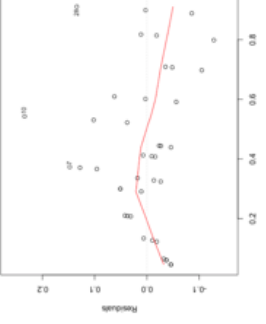
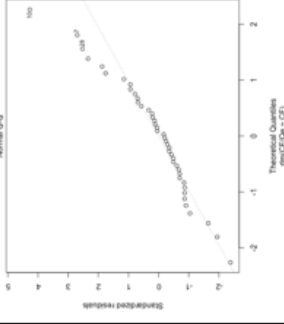
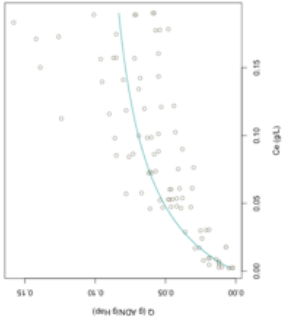
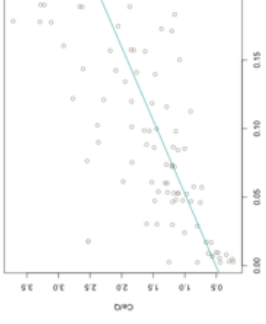
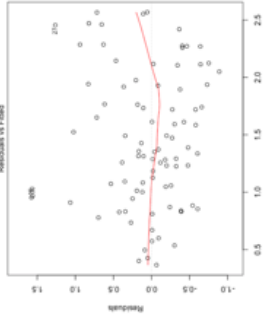
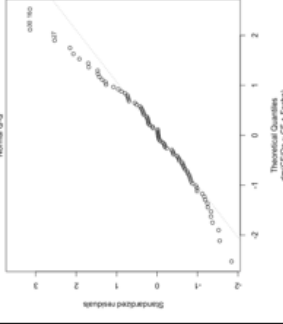
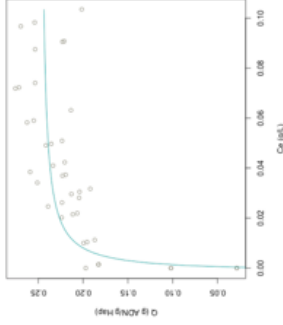
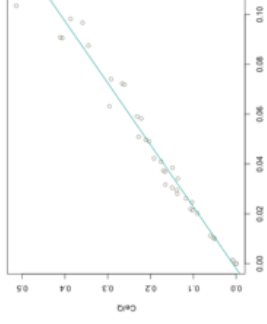
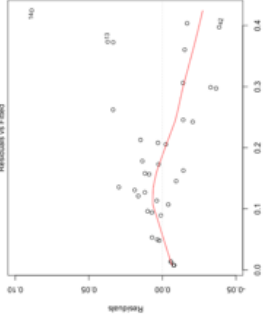
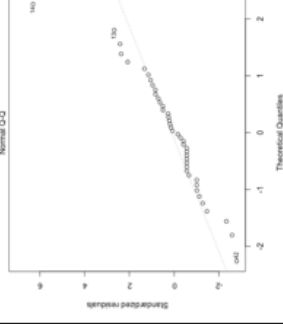
Apéndice 8. Electroforesis del ADN fragmentado, en gel de agarosa. La línea "A" corresponde al marcador de peso molecular y la línea "B" al ADN fragmentado. Los asteriscos (*) determinan el inicio y final de la banda.



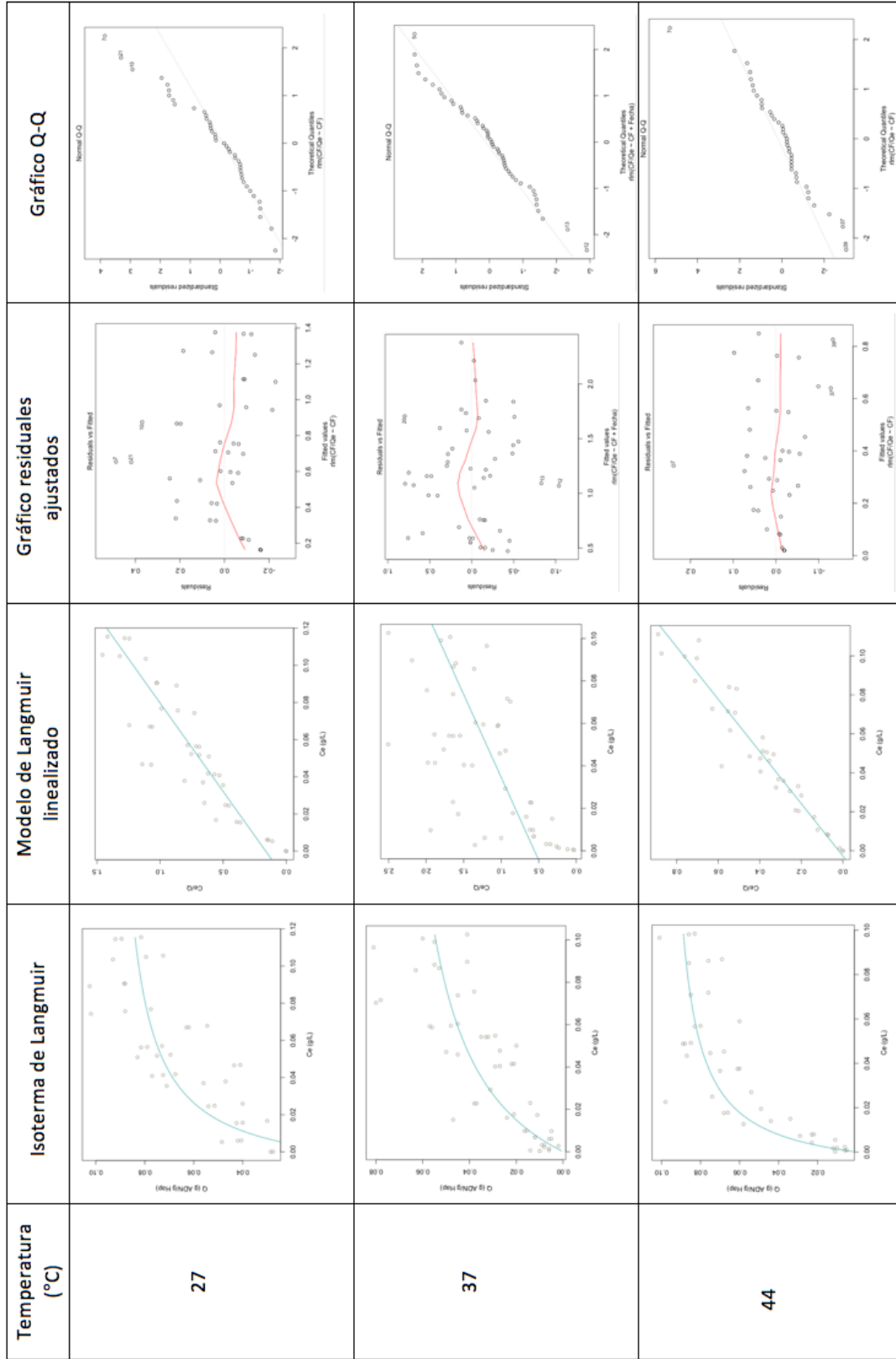
Apéndice 9. Resultados y análisis estadísticos de las isotermas de adsorción de Langmuir, para Hap-5.

Temperatura (°C)	Isoterma de Langmuir	Modelo de Langmuir linealizado	Gráfico residuales ajustados	Gráfico Q-Q
27				
37				
44				

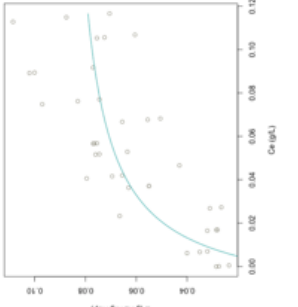
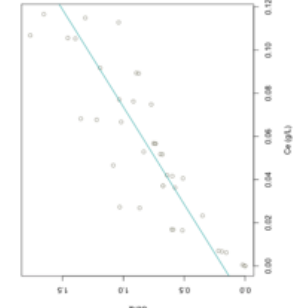
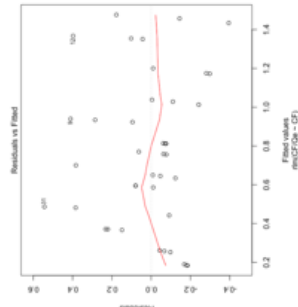
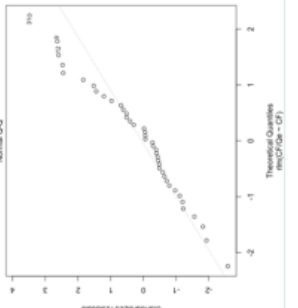
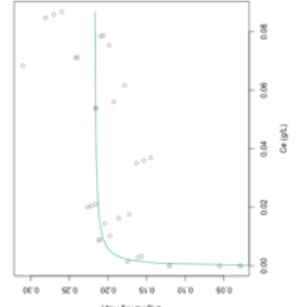
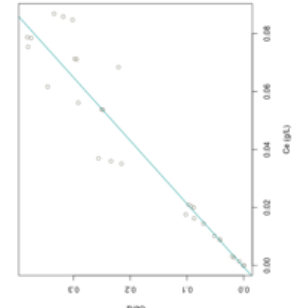
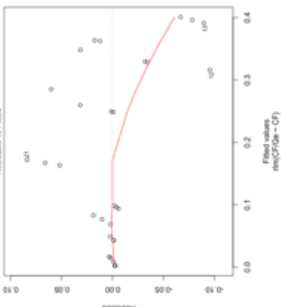
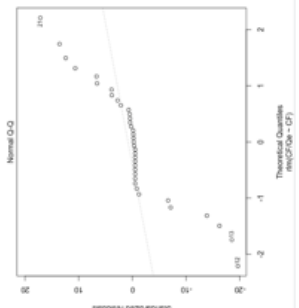
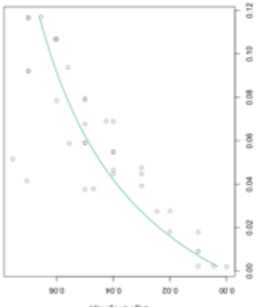
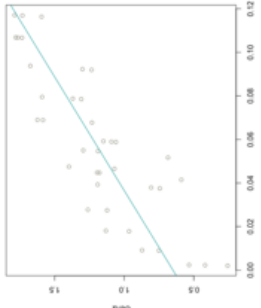
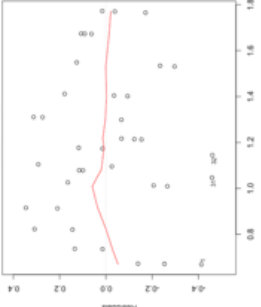
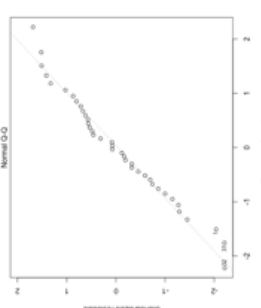
Apéndice 10. Resultados y análisis estadísticos de las isotermas de adsorción de Langmuir, para Hap-7.

Temperatura (°C)	Isoterma de Langmuir	Modelo de Langmuir linealizado	Gráfico residuales ajustados	Gráfico Q-Q
27				
37				
44				

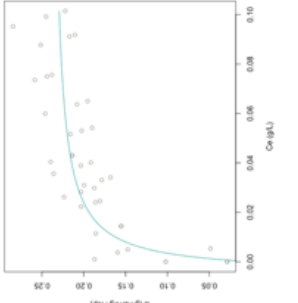
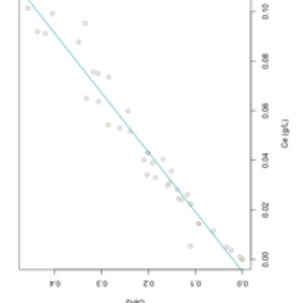
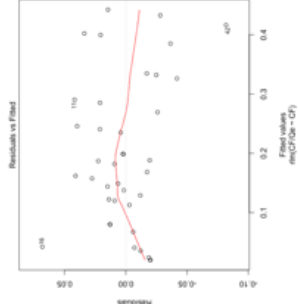
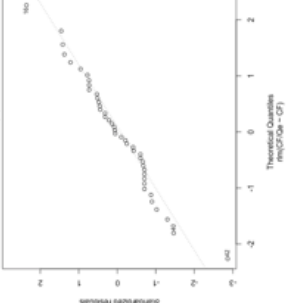
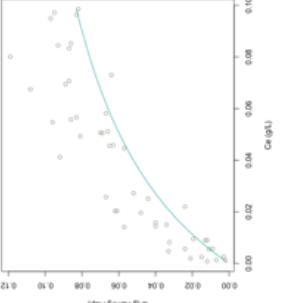
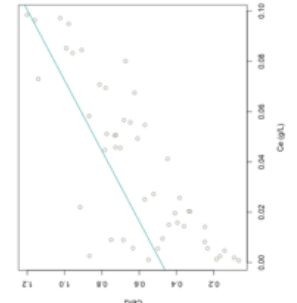
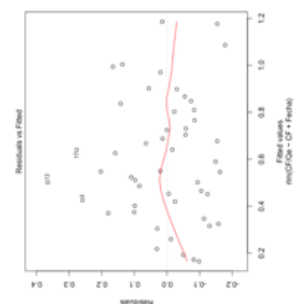
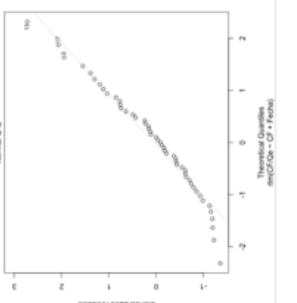
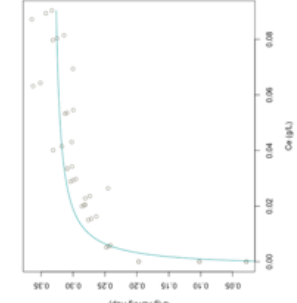
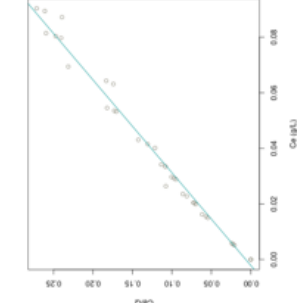
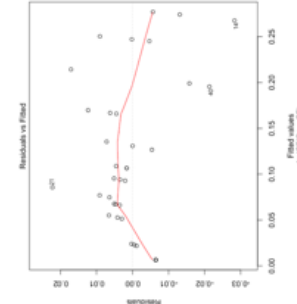
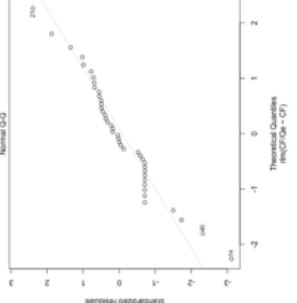
Apéndice 1.1. Resultados y análisis estadísticos de las isotermas de adsorción de Langmuir, para Hap-9.



Apéndice 12. Resultados y análisis estadísticos de las isotermas de adsorción de Langmuir, para Hap-suc.

Temperatura (°C)	Isoterma de Langmuir	Modelo de Langmuir linealizado	Gráfico residuales ajustados	Gráfico Q-Q
27				
37				
44				

Apéndice 13. Resultados y análisis estadísticos de las isotermas de adsorción de Langmuir, para Hap-anhsuc.

Temperatura (°C)	Isoterma de Langmuir	Modelo de Langmuir linealizado	Gráfico residuales ajustados	Gráfico Q-Q
27				
37				
44				

Apéndice 14. Resultados y análisis estadísticos de las isotermas de adsorción de Langmuir, para Hap-amino.

