

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Diseño y caracterización de nanopartículas luminiscentes para
su aplicación en regeneración ósea y angiogénesis**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Lisandra Victoria Lozano Barajas

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Lisandra Victoria Lozano Barajas

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Patricia Juárez Camacho
Codirectora de tesis

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores
Codirector de tesis

Dr. Pablo Loza Álvarez

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

Dr. Prakhar Sengar



Dr. Alejandro Huerta Saquero
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Lisandra Victoria Lozano Barajas** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Diseño y caracterización de nanopartículas luminiscentes para su aplicación en regeneración ósea y angiogénesis

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Codirectora de tesis

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores
Codirector de tesis

El desarrollo de biomateriales funcionales representa una estrategia prometedora para la ingeniería y regeneración de tejidos óseos. En este trabajo se diseñaron y caracterizaron nanomateriales luminiscentes de hidroxiapatita (HAp) dopados con iones de Europio (Eu^{3+}), con el objetivo de evaluar su potencial aplicación en procesos de regeneración ósea y angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*. Los nanomateriales fueron sintetizados mediante los métodos de combustión e hidrotermal variando los parámetros de tipo de combustible, temperatura de reacción y temperatura de tratamiento térmico. En consiguiente, fueron caracterizados fisicoquímicamente por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Microscopía Electrónica de transmisión (MET), Difracción de Rayos-X (XRD), Espectroscopía de Dispersión de Energía (EDS), Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), análisis BET de área superficial y estudios ópticos de fotoluminiscencia (PL) y catodoluminiscencia (CL). Para evaluar la viabilidad celular y la biotoxicidad de los nanomateriales sintetizados, se realizaron ensayos *in vitro* incluyendo pruebas de viabilidad celular y detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante microscopia confocal de fluorescencia. Adicionalmente, se realizaron estudios *in vivo* en embriones y larvas de pez cebra (*Danio rerio*), utilizando exposición oral y microinyección. Los resultados demostraron que los nanomateriales de HAp: Eu^{3+} presentaron morfología cuasi-esférica y de nanorods, consistente con el método de síntesis. Con tamaño nanométrico y homogéneo de 125.06 nm en promedio, fase cristalina predominante de hidroxiapatita y propiedades luminiscentes estables con emisión en el rojo (620 nm), lo que favorece su aplicación en bioimagen. En las pruebas *in vitro*, los nanomateriales mostraron adecuada biocompatibilidad y generación controlada de ROS, resultados prometedores para posibles aplicaciones asociadas a la angiogénesis. Los estudios en pez cebra revelaron que los nanomateriales son de uso seguro y su efecto en embriones y larvas es dosis dependiente. En conclusión, los nanomateriales luminiscentes de hidroxiapatita dopados con europio constituyen una plataforma prometedora para estrategias de regeneración ósea y angiogénesis, con ventajas adicionales para la bioimagen al obtener emisiones dentro de la primer ventana biológica del organismo.

Palabras clave: teragnosis, hueso, vasculatura, luminiscencia, materiales luminiscentes, bioimagen, pez cebra.

Abstract of the thesis presented by **Lisandra Victoria Lozano Barajas** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

Design and Characterization of luminescent materials for their application in bone regeneration and angiogenesis

Abstract approved by:

Dra. Patricia Juárez Camacho

Thesis co-advisor

Dr. Gustavo A. Hirata Flores

Thesis co-advisor

The development of functional biomaterials represents a promising strategy for bone tissue engineering and regeneration. In this work, luminescent hydroxyapatite (HAp) nanomaterials doped with europium ions (Eu^{3+}) were designed and characterized with the aim of evaluating their potential application in bone regeneration and angiogenesis, both *in vitro* and *in vivo*. The nanomaterials were synthesized using combustion and hydrothermal methods, varying parameters such as fuel type, reaction temperature, and annealing temperature. The obtained samples were physicochemically characterized by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), Brunauer–Emmett–Teller (BET) surface area analysis, and optical studies of photoluminescence (PL) and cathodoluminescence (CL). To assess cellular viability and the biotoxicity of the synthesized nanomaterials, *in vitro* assays were performed, including viability tests and detection of reactive oxygen species (ROS) by confocal fluorescence microscopy. Additionally, *in vivo* studies were conducted in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae, employing both oral exposure and microinjection. The results demonstrated that HAp:Eu³⁺ nanomaterials exhibited quasi-spherical and nanorod morphologies, consistent with the synthesis method, with homogeneous nanometric size averaging 125.06 nm, a predominant hydroxyapatite crystalline phase, and stable luminescent properties with red emission at 620 nm, favoring their application in bioimaging. In *in vitro* assays, the nanomaterials showed suitable biocompatibility and controlled ROS generation, which are promising for potential applications related to angiogenesis. Zebrafish studies revealed that the nanomaterials are safe for use, with effects on embryos and larvae being dependent on concentration treatment. In conclusion, europium-doped luminescent hydroxyapatite nanomaterials constitute a promising platform for bone regeneration and angiogenesis strategies, with additional advantages for bioimaging due to their emission within the first biological window of the organism.

Keywords: theranostics, bone, vasculature, luminescence, luminescent materials, bioimage, zebrafish.

Dedicatoria

Al Dr. Peter Bernbeck

*Cuando todo lo demás ha desaparecido, los huesos permanecen,
y en sus restos vemos trazas de aquellos que alguna vez vivieron.*

Agradecimientos

Este logro no es únicamente resultado de un esfuerzo individual, sino también del respaldo constante de quienes, de distintas formas, contribuyeron a la realización de este proyecto. A todos quienes me acompañaron en este trayecto, expreso mi sincera gratitud. Su confianza, apoyo y acompañamiento fueron fundamentales para alcanzar esta meta que, más allá de lo académico, ha representado un auténtico proceso de crecimiento personal y profesional.

A mi madre, Elvira Lozano Barajas, porque sin ella simplemente no sería yo en todos los sentidos. Por su compañía y su apoyo a lo largo de mis 26 años de vida. Por ser un verdadero ejemplo de éxito.

A mis abuelos, Elvira Barajas Bucio y Pedro Lozano Cabello, gracias por quererme como a una hija y dedicarme su tiempo y energía. Por recibirme siempre con los brazos abiertos en su casa.

A mi familia. Especialmente a Pedro Lozano Barajas, compañero de vida desde mi nacimiento; a Jerónimo Lozano Ruíz, mi primo favorito; a Itzel García Lozano, quien me ha enseñado tanto desde que tengo memoria; a Marisol Lozano Barajas y Adriana Lozano Barajas, por ser unas segundas madres para mí; a Danna Paola García Lozano, por siempre creer en mí.

A Peter Bernbeck, quien fue como un padre para mí. Gracias por enseñarme a disfrutar de algunas de las cosas más valiosas en mi vida: leer, armar rompecabezas y viajar. Su partida en los inicios de esta maestría fue dolorosa, pero sé que me sigue acompañando en cada meta. También agradezco a su familia, en especial al Sr. Ernesto, Juanita, Omar, Tania y Marlo; así como a Laura Sennerich, 'meine liebe Freundin'.

A mis amigos, por su compañía y apoyo constante. En especial a Alhelí Suárez Alvarado, Anna Lucía de Santos Medina y Edgar Misael Armienta Chavarria, con quienes no solo he compartido la cancha, sino también la complicidad y la amistad sincera; y a Raúl Eduardo Santoy Flores, por quererme tanto y hacerme crecer en todos los ámbitos.

A mí, Lisandra Victoria Lozano Barajas, por no rendirme ante los retos, por ser genuina, por creer en mí, por mi disciplina y ética profesional, características que se ven reflejadas en la presente tesis.

A mis directores de tesis, Dr. Gustavo A. Hirata Flores y la Dra. Patricia Juárez Camacho, grandes maestros y profesionistas, por su habilidad para transmitir el conocimiento y su acompañamiento durante esta etapa.

A mi comité de tesis, por sus valiosas aportaciones para el éxito del proyecto. En especial al Dr. Prakhar Sengar siempre pendiente en el laboratorio, al Dr. Pablo Loza por recibirme de estancia en su laboratorio, a la Dra. Carmen Paniagua por el acceso a sus instalaciones y equipo en SUBNARGENA. También al Dr. Ricardo González por su apoyo en lo referente al pez cebra. Y a los técnicos de CICESE y CNyN por su ayuda en las caracterizaciones fisicoquímicas.

A los peces cebra, mi modelo experimental, por su invaluable aporte a la ciencia y por mostrarme cuán impresionante es la vida desde sus primeros estadios hasta el último latido.

Al Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada, Baja California y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM, por brindarme las herramientas y el espacio para desarrollarme como investigadora.

Agradezco al proyecto DGAPA-UNAM No. IN-113823 por el financiamiento para el desarrollo de la presente tesis.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, y a todos los mexicanos que con sus impuestos hacen posible el impulso a la ciencia y la educación, por el apoyo económico durante mis estudios de maestría.

A Dios, por acompañarme en cada paso de este recorrido.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas	xiv
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Tejido óseo	2
1.1.2 Proceso de remodelación ósea	4
1.1.3 Patologías y lesiones del sistema musculoesquelético	5
1.1.4 Angiogénesis e ingeniería de tejidos óseos.....	6
1.2 Nanomateriales	6
1.2.1 Hidroxiapatita.....	7
1.2.1.1 Nano-hidroxiapatita	7
1.2.2 Materiales luminiscentes	8
1.2.2.1 Europio	8
1.3 Aplicaciones en nanomedicina.....	9
1.3.1 Aplicaciones de la hidroxiapatita en osteogénesis	9
1.3.2 Aplicaciones del europio en angiogénesis	10
1.3.3 Bioimagen.....	11
1.4 Danio Rerio.....	11
1.5 Hipótesis.....	13
1.6 Objetivos	13

1.6.1	Objetivo general	13
1.6.2	Objetivos específicos.....	14
Capítulo 2.	Metodología.....	15
2.1	Síntesis de nanopartículas luminiscentes	15
2.1.1	Síntesis por combustión	15
2.1.2	Síntesis hidrotermal	16
2.2	Caracterización fisicoquímica de nanopartículas luminiscentes.....	17
2.2.1	Microscopía Electrónica de Barrido	18
2.2.2	Microscopía Electrónica de Transmisión.....	19
2.2.3	Análisis Brunauer, Emmett and Teller (BET)	20
2.2.4	Difracción de Rayos-X.....	21
2.2.5	Espectroscopía de Dispersión de Energía.....	22
2.2.6	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier	22
2.2.7	Fotoluminiscencia	23
2.2.8	Catodoluminiscencia	23
2.3	Ensayos <i>in vitro</i>	24
2.3.1	Líneas celulares	24
2.3.2	Ensayo de viabilidad celular	24
2.3.3	Ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno.....	25
2.3.3.1	Ensayo con reactivo DPBF sin presencia de células	25
2.3.3.2	Ensayo con reactivo CellRox Deep Red en presencia de células.....	27
2.3.3.3	Microscopio confocal	28
2.4	Ensayos <i>in vivo</i>	29
2.4.1	Condiciones del sistema, reproducción y crecimiento del pez cebra	29
2.4.2	Ensayo de toxicidad en embriones y larvas	29
2.4.2.1	Exposición oral	30
2.4.2.2	Microinyección	31

2.5	Análisis Estadístico	31
Capítulo 3.	Resultados.....	33
3.1	Síntesis de nanopartículas luminiscentes	33
3.1.1	Síntesis por combustión	34
3.1.2	Síntesis hidrotermal	35
3.2	Caracterización fisicoquímica de nanopartículas luminiscentes.....	35
3.2.1	Microscopía Electrónica de Barrido	35
3.2.2	Microscopía Electrónica de Transmisión.....	36
3.2.3	BET.....	37
3.2.4	Difracción de Rayos-X.....	38
3.2.5	Espectroscopía de Dispersión de Energía.....	40
3.2.6	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier	41
3.2.7	Fotoluminiscencia	42
3.2.8	Catodoluminiscencia	43
3.3	Ensayos <i>in vitro</i>	44
3.3.1	Ensayo de viabilidad celular	44
3.3.2	Ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno.....	46
3.3.2.1	Ensayo con reactivo DPBF sin presencia de células	46
3.3.2.2	Ensayo con reactivo CellROX Deep Red en presencia de células.....	47
3.4	Ensayos <i>in vivo</i>	50
3.4.1	Condiciones del sistema, reproducción y crecimiento del pez cebra	50
3.4.2	Ensayo de toxicidad en embriones y larvas	51
3.4.2.1	Exposición oral	51
3.4.2.2	Microinyección	55
Capítulo 4.	Discusión	56
4.1	Síntesis de nanopartículas luminiscentes	56
4.2	Caracterizaciones fisicoquímicas.....	57

4.3	Ensayos <i>in vitro</i>	58
4.3.1	Viabilidad celular	58
4.3.2	Generación de especies reactivas de oxígeno	59
4.4	Ensayos <i>in vivo</i>	60
4.4.1	Ensayos de toxicidad	60
4.4.1.1	Ensayos en embriones de pez cebra	60
4.4.1.2	Ensayos en larvas de pez cebra	61
Capítulo 5.	Conclusiones.....	62
5.1	Conclusiones.....	62
5.2	Perspectivas	63
	Literatura citada..	64
	Anexo.....	68

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Composición del tejido óseo.	3
Figura 2. Proceso de remodelación ósea.	5
Figura 3. Esquema de un material luminiscente.	8
Figura 4. El pez cebra como modelo en regeneración ósea, angiogénesis y nanotoxicología.	13
Figura 5. Esquema general de la síntesis por combustión para las HAp:Eu ³⁺	15
Figura 6. Esquema general de la síntesis hidrotérmal para las HAp:Eu ³⁺	17
Figura 7. Esquema del SEM.	19
Figura 8. Esquema de formación de imágenes en un microscopio electrónico de transmisión (TEM).	20
Figura 9. Esquema del XRD.	21
Figura 10. Esquema del ensayo de viabilidad celular.	24
Figura 11. Esquema del ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno usando DPBF.	26
Figura 12. Esquema del ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno utilizando el reactivo CellROX Deep Red.	27
Figura 13. Esquema básico de un microscopio confocal.	28
Figura 14. Esquema del experimento de toxicidad mediante exposición oral en embriones y larvas de pez cebra.	30
Figura 15. Esquema del experimento de toxicidad mediante la técnica de microinyección.	31
Figura 16. Fotografías correspondientes a las HAp:Eu ³⁺	34
Figura 17. Imágenes SEM correspondientes a las muestras de HAp:Eu ³⁺	36
Figura 18. Imagen TEM e histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas (HAp:Eu ³⁺ -CB-CTAB650).	36
Figura 19. Imagen TEM e histograma de distribución de tamaño de las nanorods (HAp:Eu ³⁺ -HT).	37
Figura 20. XRD de nanopartículas.	38
Figura 21. XRD de nanorods.	39

Figura 22. Gráficas de EDS para HAp:Eu ³⁺ : a) Nanopartículas (HAp:Eu ³⁺ -CB-CTAB650), b) Nanorods (HAp:Eu ³⁺ -HT).	41
Figura 23. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier de nanopartículas (HAp:Eu ³⁺ -CB-CTAB650) y nanorods (HAp:Eu ³⁺ -HT).	42
Figura 24. Espectros de fotoluminiscencia para nanopartículas (HAp:Eu ³⁺ -CB-CTAB650) y nanorods (HAp:Eu ³⁺ -HT).	43
Figura 25. Espectro de catodoluminiscencia de nanopartículas (HAp:Eu ³⁺ -CB-CTAB650) y nanorods (HAp:Eu ³⁺ -HT).	43
Figura 26. Ensayo de viabilidad celular de la línea celular de pre-osteoblastos de ratón MC3T3-E1 tratada por 24 horas con distintas concentraciones de nanopartículas y nanorods.	44
Figura 27. Ensayo de viabilidad celular de la línea de células epiteliales humanas 293T tratadas por 24 horas con distintas concentraciones de nanopartículas y nanorods.	45
Figura 28. Intensidad relativa de los espectros de emisión para las diluciones con distintas concentraciones de nanopartículas (HAp:Eu ³⁺ -CB-CTAB650) y nanorods (HAp:Eu ³⁺ -HT), así como dilución control del ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno sin presencia de células utilizando el reactivo DPBF.	46
Figura 29. Gráfica de intensidad relativa versus concentración de nanomaterial del ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno sin presencia de células utilizando DPBF.	47
Figura 30. Imágenes de microscopio confocal de fluorescencia del ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno empleando la línea celular HFF-1 de fibroblastos humanos tratadas por 24 horas con distintas concentraciones de nanorods.	48
Figura 31. Gráfica de intensidad promedio versus concentración de nanomaterial del ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno empleando la línea celular HFF-1 de fibroblastos humanos tratadas por 24 horas con distintas concentraciones de nanorods.	49
Figura 32. Histórico de las mediciones de calidad del agua del acuario y ciclo del nitrógeno.	50
Figura 33. Supervivencia de embriones descorionados tratados con nanopartículas y nanorods por exposición oral.	52
Figura 34. Efecto de la concentración en el porcentaje de supervivencia de los embriones de pez cebra tratados con HAp:Eu ³⁺ .	53
Figura 35. Análisis por cepa y HAp:Eu ³⁺ del efecto de la concentración en el porcentaje de supervivencia de los embriones de pez cebra.	54
Figura 36. Observaciones del experimento de microinyección en embriones Fli.	55
Figura 37. Esquema de una molécula de HAp:Eu ³⁺ .	56
Figura 38. Nanopartículas sintetizadas por el método de combustión, utilizando como combustible la carbohidrazida y tratadas térmicamente a 1100°C.	68

Figura 39. Nanopartículas sintetizadas por el método de combustión, utilizando como combustible la carbohidrazida y tratadas térmicamente a 650°C..	68
Figura 40. Nanopartículas sintetizadas por el método hidrotermal, utilizando CTAB y tratadas térmicamente a 650°C..	69
Figura 41. Nanopartículas sintetizadas por el método hidrotermal y tratadas térmicamente a 200°C..	69
Figura 42. Nanopartículas sintetizadas por el método hidrotermal y tratadas térmicamente a 400°C..	70
Figura 43. Nanopartículas sintetizadas por el método hidrotermal y tratadas térmicamente a 500°C..	70
Figura 44. XRD de HAp:Eu ³⁺	71
Figura 45. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier de las HAp:Eu ³⁺	72
Figura 46. Espectros de fotoluminiscencia de todas las síntesis de HAp:Eu ³⁺	73
Figura 47. Histograma del tamaño de nanopartículas medidas fuera del embrión en los pocillos tratados	74
Figura 48. Larvas tratadas con distintas concentraciones de nanopartículas y nanorods a las 96 hpf..	75
Figura 49. Imágenes por microscopia confocal de fluorescencia de nanopartículas no internalizadas, presentes fuera de embrión WT del ensayo por exposición oral.....	76
Figura 50. Imágenes por microscopia confocal de fluorescencia de nanomateriales internalizados en embrión WT del ensayo por exposición oral.....	77
Figura 51. Imágenes obtenidas mediante la técnica de excitación por dos fotones.....	78

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Técnicas de caracterización de las propiedades de los nanomateriales.....	18
Tabla 2. HAp:Eu ³⁺ : precursores, métodos de síntesis, combustible, tratamiento térmico y nomenclatura.....	33
Tabla 3. Análisis del histórico de los parámetros de la calidad del agua.....	51
Tabla 4. Efectos del tiempo-concentración-HAp:Eu ³⁺ en la tasa de supervivencia de los embriones tratados por la técnica de exposición oral.....	52

Capítulo 1. Introducción

El tejido óseo es una estructura dinámica y altamente vascularizada, la cual además de brindar soporte mecánico y protección a los órganos vitales, también participa en procesos fundamentales para el organismo como la hematopoyesis y el metabolismo mineral (Universidad Veracruzana, 2018). Sin embargo, lesiones externas, enfermedades degenerativas y alteraciones inducidas por el envejecimiento comprometen su capacidad regenerativa, lo que propicia una elevada incidencia de las patologías musculoesqueléticas a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud, 2021; Portal-Núñez et al., 2012; Xia et al., 2025).

Dentro del campo de la nanomedicina, la ingeniería de tejidos óseos ha emergido como una estrategia interdisciplinaria para superar las limitaciones referentes a los tratamientos actuales enfocados en las lesiones y patologías del sistema musculoesquelético. Biomateriales como la hidroxiapatita (HAp) han sido ampliamente estudiados debido a su similitud química con la composición del hueso natural, su biocompatibilidad y sus propiedades de osteoconducción (Damiri et al., 2024; Ray Tjeh Lim et al., 2023). Sin embargo, sus limitaciones asociadas con la resorción pueden ser mitigadas mediante el uso de nano-hidroxiapatita (nHAp), la cual debido a sus dimensiones mejora la interacción con células y tejidos. Así mismo, es posible utilizarla como red anfitriona para el dopaje con distintos iones, que permiten modular características físicas, químicas y ópticas de este material, aumentando así su potencial terapéutico (Zantye et al., 2019).

En este contexto, el europio (Eu^{3+}) se ha posicionado como un activador destacado entre el grupo de los lantánidos, puesto que además de conferir propiedades luminiscentes a la nHAp, lo que lo convierte en candidato para su uso en Bioimagen y monitoreo en tiempo real, también se ha relacionado con efectos osteogénicos y angiogénicos (Natarajan et al., 2022; Wu et al., 2023). Estudios previos han demostrado que el Eu^{3+} puede mimetizar las funciones del calcio, favoreciendo la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, mejorando las tasas de mineralización y facilitando la regeneración del tejido óseo en modelos animales (M. Liu et al., 2021), además de inducir angiogénesis mediante la generación controlada de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Patra et al., 2011). Así, la nHAp dopada con europio es considerado como un biomaterial multifuncional con aplicaciones en regeneración ósea y en la formación de vasos sanguíneos.

En este trabajo, se diseñaron y caracterizaron, fisicoquímica y ópticamente, materiales luminiscentes de hidroxiapatita dopada con europio. Posteriormente, se evaluaron mediante ensayos *in vitro* de viabilidad celular y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como en modelos *in vivo* de embriones y larvas de pez cebra, con el objetivo de explorar su aplicación en la regeneración ósea y la angiogénesis, contribuyendo al desarrollo de estrategias innovadoras en nanomedicina.

1.1 Antecedentes

Tejido óseo

El tejido óseo es una estructura dinámica y altamente vascularizada constituida por una matriz inorgánica o mineral, y una fracción celular activa, cuyas funciones principales son dar soporte a los tejidos blandos, protección a los órganos internos, movimiento de los músculos, producción de células sanguíneas dentro de la médula ósea mediante la hematopoyesis y fungir como un reservorio de minerales, principalmente de fósforo y calcio, conservando así la homeostasis en el organismo (Figura 1).

El hueso está constituido químicamente en promedio por 25% de agua, 45% de minerales como fosfato y carbonato de calcio, y 30% de materia orgánica principalmente colágeno y otras proteínas. Los componentes inorgánicos alcanzan un 65% del peso óseo, mientras que la fracción orgánica un 35%. Las células que componen el tejido óseo son:

Células osteoprogenitoras: células mesenquimales ubicadas en la capa interna del periostio, en el endostio y en los canales del hueso que contienen los vasos sanguíneos. A partir de ellas se generan los osteoblastos y los osteocitos.

Osteoblastos: células que forman el tejido. Segregan colágeno y otros materiales utilizados para la construcción del hueso. Se encuentran en las superficies óseas y a medida que maduran segregan los materiales de la matriz ósea, esta los va envolviendo, convirtiéndolos en osteocitos.

Osteocitos: células maduras que han perdido la capacidad de dividirse, estas son derivadas de los osteoblastos que constituyen la mayor parte del tejido óseo y a diferencia de los osteoblastos, no segregan materiales de la matriz ósea. Sus funciones son de mantenimiento del tejido, como el intercambio de nutrientes y productos de desecho.

Osteoclastos: células que se asientan sobre la superficie del hueso y proceden a la destrucción de la matriz ósea, es decir la resorción ósea (TSU en Urgencias Médicas, s.f.).

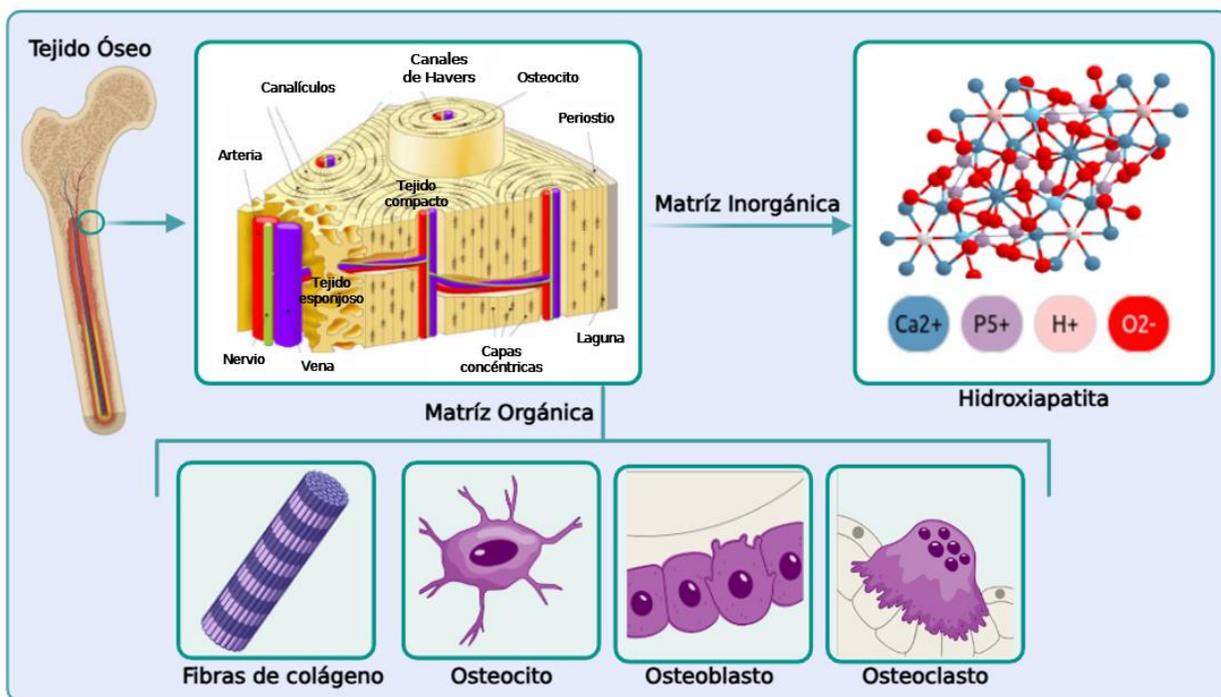


Figura 1. Composición del tejido óseo. Diagrama de la estructura del hueso, compuesto por una matriz orgánica constituida a su vez por fibras de colágeno y las células óseas, estas células son las protagonistas de los procesos de desarrollo, crecimiento, mantenimiento y reparación de los tejidos, y una matriz inorgánica constituida principalmente por cristales de hidroxiapatita. Esquema realizado en BioRender.

Dependiendo de cómo se organicen las células óseas, conforman dos tipos diferentes de tejido: tejido óseo compacto y tejido óseo esponjoso. El tejido óseo compacto está organizado en capas concéntricas de células y matriz intercelular, denominadas “sistemas de Havers”, que le confieren dureza y consistencia. En su región central se encuentra la médula ósea amarilla, formada por grasa. Por otro lado, el tejido óseo esponjoso está organizado en láminas entrecruzadas que forman una estructura trabecular característica, donde los espacios generados son ocupados por la médula ósea roja, responsables de la producción de células sanguíneas (Flores-Luna, 2023).

Parte fundamental para el desarrollo normal del tejido óseo es la vascularización, ya que asegura el suministro de células sanguíneas, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento. Esta función está asociada al periostio, tejido conjuntivo altamente vascularizado que recubre tanto al tejido óseo compacto como al esponjoso, actuando además como barrera protectora y facilitando el crecimiento del hueso en grosor.

El tejido óseo es inervado por el sistema nervioso autónomo y por fibras nerviosas sensoriales. Se han encontrado fibras autónomas en periostio, endostio, hueso cortical y asociadas a los vasos sanguíneos de los conductos de Volkmann, así como neuropéptidos y sus receptores en el hueso (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil et al., 2004).

1.1.1 Proceso de remodelación ósea

El tejido óseo está sometido a distintos procesos durante toda la vida, uno de estos es la remodelación ósea, la cual implica la reabsorción y formación de la matriz extracelular con el fin de regular la homeostasis mineral y reparar y moldear los huesos. Las fases son secuenciales y comienzan con la activación, reabsorción, inversión, formación y terminación.

- **Activación:** comienza con un estímulo inicial, como el estrés mecánico y factores hormonales, provocando la retracción de las células de revestimiento y degradación de la matriz colágena, lo que provoca la apoptosis de los osteocitos y la osteoclastogénesis gracias al factor de crecimiento $TGF\beta$.
- **Reabsorción:** promoción de supervivencia y proliferación de osteoclastos, así como la disolución de calcio y fosfato. Durante esta fase, el factor de crecimiento $TGF-\beta 1$ atrae a las células osteoprogenitoras y modula la apoptosis de los osteoclastos, limitando así su actividad.
- **Inversión:** esta fase también es conocida como reversión y consiste en el recubrimiento de matriz colágena semimineralizada, resultando en la preparación de la superficie para la siguiente fase.
- **Formación:** gracias a los factores de crecimiento, se promueve la diferenciación celular en osteoblastos y la secreción. Los osteoblastos depositan el tejido osteoide que luego es mineralizado.
- **Terminación:** esta fase también es conocida como fase de inactividad, aquí se da a apoptosis de los osteoblastos maduros y una mineralización secundaria asociada a la formación de cristales de hidroxiapatita. El fin del proceso se obtiene cuando el hueso formado es igual al hueso reabsorbido (Levasseur, 2019).

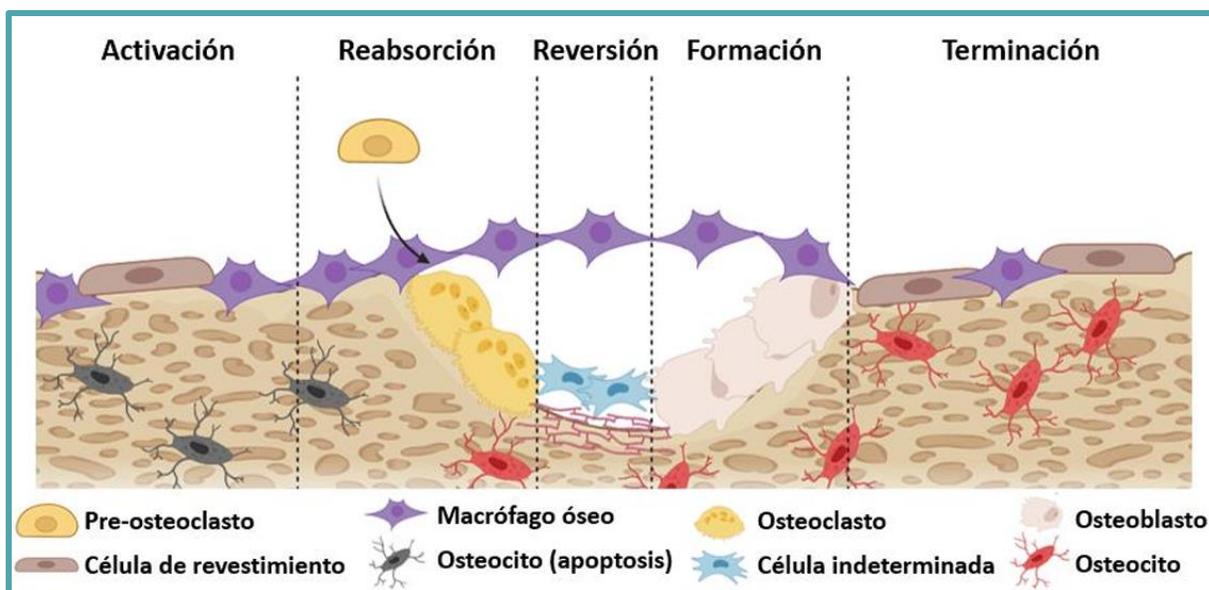


Figura 2. Proceso de remodelación ósea. Esquema de las fases de remodelación ósea y la distribución de las principales poblaciones celulares que conforman el hueso y que participan a lo largo del proceso de remodelación. Tomada de Zertuche-Arias (Zertuche-Arias, 2021).

1.1.2 Patologías y lesiones del sistema musculoesquelético

Cuando el hueso formado no es igual al hueso reabsorbido, se tiene una afectación en el proceso de remodelación ósea, lo cual ocasiona lesiones y patologías del sistema musculoesquelético, tales como: fracturas, enfermedades crónicas y trastornos asociados a la densidad ósea (Lafita, 2003). Las principales causas de pérdida ósea son el envejecimiento, el trauma y el estrés mecánico. Por otro lado, los desórdenes musculoesqueléticos más comunes son la artritis reumatoide, la osteoartritis y la osteoporosis (Xia et al., 2025).

Los trastornos del sistema musculoesquelético también son la principal causa de la necesidad de rehabilitación física, están altamente relacionados con el deterioro significativo de la salud mental y son la segunda causa de discapacidad a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud estimó en un estudio publicado en 2021, que aproximadamente 1,710 millones de personas tienen trastornos musculoesqueléticos en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2021). Actualmente, el envejecimiento constituye uno de los factores de riesgo principales en la pérdida de masa y densidad ósea, así como los cambios metabólicos en el tejido óseo asociados a la disminución de la calidad de las fibras de colágeno, capacidad de reparación de microfracturas y el aumento de resorción ante la formación ósea (Portal-Núñez et al., 2012).

1.1.3 Angiogénesis e ingeniería de tejidos óseos

La angiogénesis está definida como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes, este es un proceso crucial para mantener la homeostasis en el organismo, así como para la reparación y regeneración de los tejidos.

Las células endoteliales son las encargadas de la formación de los tubos capilares, sitio donde ocurre el intercambio de componentes del sistema inmune y que a su vez son la conexión del circuito circulatorio de venas y arterias. Dentro de las moléculas asociadas a la señalización de la angiogénesis, destaca el factor de crecimiento endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés), el cual puede ser secretado por los osteoblastos, marcando así la sinergia existente entre los mecanismos de osteogénesis y angiogénesis. En este contexto, la vascularización resulta de vital importancia para la reparación de los tejidos óseos (Malhotra & Habibovic, 2016).

Igualmente, la formación nueva de vasculatura es fundamental para que se produzca la reparación de fracturas o la regeneración ósea debido a la importancia de la existencia de oxígeno, de no estar presente éste se propensa la formación de tejido fibroso (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil et al., 2004).

1.2 Nanomateriales

De acuerdo con la Sociedad Estadounidense para Pruebas y Materiales (ASTM, por sus siglas en inglés), la Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés) y el Instituto Nacional de Salud Ocupacional y Seguridad (NIOSH, por sus siglas en inglés), las partículas con un diámetro entre 1 y 100 nm se denominan nanopartículas (NPs). En décadas recientes, la síntesis, análisis y aplicación de nanopartículas se ha incrementado considerablemente, a su vez ha generado el surgimiento de una nueva disciplina denominada nanomedicina. La nanomedicina emplea las áreas de conocimiento de la química, la física y la medicina con un enfoque en aplicaciones biomédicas, estas incluyen el desarrollo de biosensores moleculares, farmacología, terapias diversas, bioimagen e ingeniería de tejidos (Haque & Ward, 2018). La ingeniería de tejidos se destaca como una solución viable para el reemplazo de órganos que presentan alguna lesión o que han sido perdidos. La ingeniería de tejidos óseos, BTE por sus siglas en inglés, es un área de investigación multidisciplinaria cuyo objetivo es reparar o reemplazar los tejidos óseos dañados. En este contexto, el desarrollo de biomateriales que puedan apoyar al crecimiento y diferenciación de las células óseas es de carácter esencial (Damiri et al., 2024) y dentro de los

nanomateriales más estudiados se destacan los fosfatos de calcio (CaPs, por sus siglas en inglés) en sus distintas fases incluyendo fosfato monocálcico ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}/\text{P}=0.5$), fosfato dicálcico (CaHPO_4 , $\text{Ca}/\text{P}=1.0$), fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $\text{Ca}/\text{P}=1.5$) e hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $\text{Ca}/\text{P}=1.67$) (Sundarabharathi et al., 2018).

1.2.1 Hidroxiapatita

Debido a su gran similitud química con la hidroxiapatita (HAp) natural del hueso, alta biocompatibilidad, bioactividad y naturaleza no tóxica, la HAp sintetizada de manera artificial es un material prometedor para diferentes aplicaciones en medicina y en la administración de medicamentos (Zantye et al., 2019). La HAp es un material biocerámico que tiene conferida las características de osteoinductividad y osteoconductividad, es decir, que funciona como una estructura adecuada para guiar la formación de cartílago y la deposición de tejido duro, proporcionando además un soporte para que proliferen los vasos sanguíneos (Pontes et al., 2024). La HAp se utiliza normalmente en forma de polvo, y su eficacia está influenciada por diversas propiedades, como cristalinidad, fuentes precursoras, tamaño de las partículas, morfología y superficie.

Sin embargo, la HAp presenta una resorción lenta dificultando el proceso de remodelación ósea provocando a su vez vulnerabilidad en el hueso. Con el fin de superar las desventajas asociadas a este material, se ha desarrollado la nano-hidroxiapatita.

1.2.1.1 Nano-hidroxiapatita

La hidroxiapatita de tamaño nanométrico o nano-hidroxiapatita (nHAp) ofrece aplicaciones especiales en nanomedicina, convirtiéndola en un candidato ideal para la ingeniería de tejidos óseos, ya que imita el tamaño de las partículas minerales de HAp endógenas que se encuentran de manera natural en el hueso. Así mismo, la nHAp tiene una mayor proporción superficie-volumen que la HAp, facilitando la resorción de esta (Gillman & Jayasuriya, 2021), por lo que desempeña un papel esencial en la integración y crecimiento óseo, así como en la mineralización de secciones faltantes asociadas a patologías de este sistema. Dentro de las propiedades asociadas a la nHAp destaca su capacidad para formar enlaces químicos con los huesos, la ausencia de toxicidad y de inflamación a tejidos circundantes, la habilidad de estimular directamente a

las células asociadas al crecimiento del tejido óseo (osteoblastos) y su habilidad para ser utilizado como un acarreador de medicamentos para defectos óseos (Damiri et al., 2024; Xing et al., 2019).

La nHAp posee una red cristalina hexagonal, donde los iones de calcio pueden ser fácilmente sustituidos por otros iones divalentes y trivalentes sin afectar su integridad estructural (Zantye et al., 2019).

1.2.2 Materiales luminiscentes

Un material luminiscente se define como un sólido capaz de transformar ciertos tipos de energía en radiación electromagnética, generalmente en el rango de la luz visible, aunque también puede emitir en la región ultravioleta o infrarroja. La luminiscencia puede clasificarse en diferentes tipos según el mecanismo de excitación: fotoluminiscencia, inducida por radiación electromagnética; catodoluminiscencia, generada por el bombardeo de electrones; electroluminiscencia, inducida por la aplicación de voltaje; quimioluminiscencia, resultante de una reacción química, entre otras (Blasse, 1994).

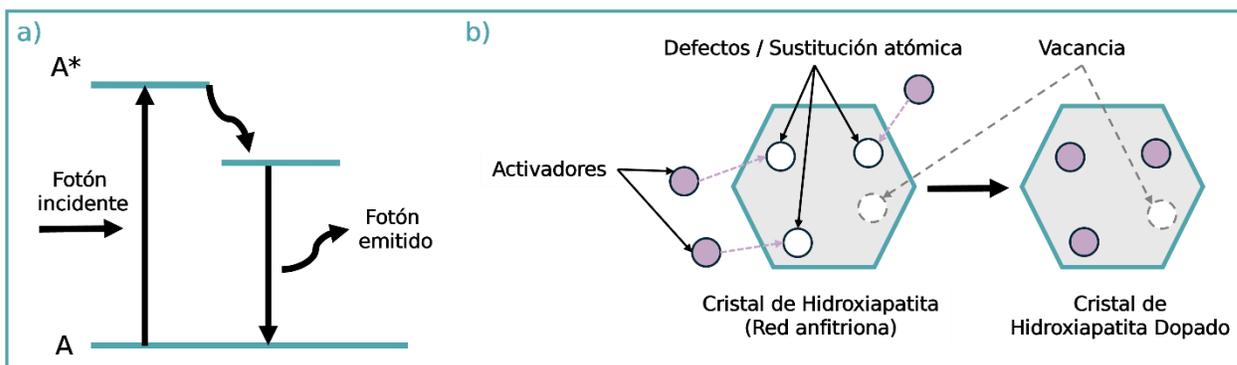


Figura 3. Esquema de un material luminiscente. Panel a) se ilustra un esquema de fotoluminiscencia donde A corresponde al estado base y A* al estado excitado. Tras la absorción de un fotón, los electrones pasan del estado A hacia niveles de mayor energía (A*). Posteriormente, al relajarse, el electrón regresa a un nivel menor de energía liberando un fotón como resultado. Panel b) se muestra un esquema del proceso de dopaje, en el cual la red anfitriona, representada por el cristal de hidroxiapatita, incorpora defectos estructurales que son ocupados por iones de materiales luminiscentes, modificando así sus propiedades ópticas.

1.2.2.1 Europio

Los lantánidos (Ln) son un grupo de 15 elementos de tierras raras, los cuales tienen la característica de emitir luminiscencia debido a sus transiciones entre los orbitales f-f (Zantye et al., 2019). Entre los

lantánidos, el Eu^{3+} es un activador que destaca para la familia de las apatitas debido a su luminiscencia estable, alta estabilidad térmica y química, así como biocompatibilidad (Sundarabharathi et al., 2018).

El europio presenta una emisión en la región roja del espectro al ser excitados a 394 nm, lo cual lo convierte como candidato idóneo para obtener imágenes luminiscentes de células y tejidos puesto que esta emisión corresponde a la primera ventana de transparencia del cuerpo humano, rango en que la luz alcanza una mayor penetración, lo que resulta especialmente útil para el seguimiento y la monitorización de la cinética de liberación de fármacos.

Además, el Europio ha despertado interés en medicina regenerativa y BTE debido a que se ha reportado que los iones de Eu^{3+} pueden imitar las funciones de los iones de Ca^{2+} , participando activamente en el proceso de remodelado óseo y siendo potencialmente útiles para el tratamiento de los trastornos de la densidad ósea, como la osteoporosis (Kargozar et al., 2020). Así mismo, el Europio también ha sido asociado a la angiogénesis, induciendo su activación a través de la producción de especies reactivas de oxígeno o ROS, por sus siglas en inglés. Esta característica resulta de gran interés en biomedicina, pues la angiogénesis es un factor crucial para regeneración de tejidos como la piel, hueso, órganos y nervios (Yoshida et al., 2023).

1.3 Aplicaciones en nanomedicina

1.3.1 Aplicaciones de la hidroxiapatita en osteogénesis

Diversos estudios asociados al dopaje con concentraciones molares de 3-5% de iones de Eu^{3+} concluyen una mejora significativa de las propiedades osteogénicas de los biomateriales como los vidrios bioactivos, los andamios de fosfatos de calcio y la hidroxiapatita (HAp). Por ejemplo, las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs, por sus siglas en inglés) dopadas con Europio favorecen la formación de tejido óseo en defectos craneales críticos a comparación de las MSNs no dopadas. De manera similar, los andamios a base de fosfatos de calcio dopados con 5% de Europio mostraron un incremento en la proliferación y migración de células pre-osteoblásticas de ratón (MC3T3-E1), además de la inhibición de resorción ósea, efectos asociados a la secreción de fosfatasa alcalina (ALP), enzima que favorece la proliferación y diferenciación de osteoblastos, por lo que resulta un candidato prometedor en osteogénesis (Wu et al., 2023).

Así mismo, se ha reportado que la HAp dopada con distintas tierras raras, incluyendo el Eu^{3+} , Nd^{3+} y Gd^{3+} tiene aplicaciones prometedoras para el tratamiento de enfermedades asociadas a trastornos de densidad ósea, debido a su influencia en el proceso de remodelación. Por otra parte, los iones de Ce^{3+} debido a sus propiedades antibacterianas, se han implementado en el tratamiento de infecciones en articulaciones como cadera y rodillas (Sundarabharathi et al., 2018).

1.3.2 Aplicaciones del europio en angiogénesis

Los biomateriales dopados con Eu han demostrado efectos favorables en la promoción de la angiogénesis en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, las MSNs dopadas con Eu mostraron capacidades angiogénicas superiores a las MSNs sin dopar y favorecieron además la cicatrización en la piel al promover la deposición de colágeno y reimplantación de células epiteliales en lesiones cutáneas. Así mismo, los nanocompuestos reforzados con nanorods de óxido de Eu poseen propiedades semejantes además de la inhibición de la inflamación temprana, promoviendo la cicatrización de tejidos y heridas (Wu et al., 2023). Por otra parte, los andamios de polifosfatos de calcio dopados con Eu reportados por Yuchong y colaboradores tuvieron mejores propiedades de proliferación y adhesión de células HUVEC, así como un aumento en la secreción de VEGF, factor de crecimiento.

Se tienen numerosos estudios acerca de los nanorods de hidróxido de Europio que en general muestran beneficios en la proliferación de células endoteliales dosis-dependiente, mejorando las tasas de angiogénesis y la cicatrización de heridas, así como la regulación de la inflamación (factores como TNF Alpha y IL-6 debido a la acción del factor angiogénico CD31) (Yoshida et al., 2023).

Patra y colaboradores realizaron nanorods de $\text{Eu}(\text{OH})_3$ sintetizados mediante el método de extracción de compuestos asistido por microondas, concluyendo que éstos mejoran la proliferación y migración de células endoteliales de vena umbilical humana de manera *in vitro* y que estimulaban el surgimiento de vasculatura *in vivo* en embriones de pez cebra, demostrando así que el mecanismo angiogénico está dado por la formación de especies reactivas de oxígeno, especialmente por el compuesto H_2O_2 (Patra et al., 2011). En otro estudio Zhao y colaboradores utilizaron los lantánidos Terbio y Europio para sintetizar nanorods y nanopartículas esféricas mediante el método hidrotérmal con el fin de observar su efecto angiogénico, demostrando que está mediado por la producción de especies reactivas de oxígeno. Se comprobó usando embriones de pez cebra transgénicos, demostrando que los embriones tratados con los

nanomateriales tienen efectos angiogénicos con circulación sanguínea en los nuevos vasos formados a las 72 horas post fertilización (Zhao et al., 2016).

Las investigaciones referentes a biomateriales dopados con Eu concluyen que a concentraciones molares de 1-5% de Eu se promueve la angiogénesis. Este rango es similar al que favorece la osteogénesis por lo que resulta particularmente útil para el presente proyecto.

1.3.3 Bioimagen

Actualmente, las imágenes de fluorescencia se han convertido en uno de los métodos más utilizados para examinar la dispersión *in vivo* de los nanomateriales debido a sus beneficios como ser no invasivos, bajo costo, la alta sensibilidad para ser detectados y la obtención de imágenes en tiempo real, dejando a un lado las limitantes asociadas a métodos convencionales como la escasa estabilidad de la luz, la poca profundidad de penetración en los tejidos, la radiotoxicidad, la baja resolución y los costos elevados (Damiri et al., 2024).

Los lantánidos tienen aplicaciones en bioimagenología gracias a sus propiedades ópticas como son el tiempo de vida de su estado de excitación/emisión y su rango de colores dependientes de sus propiedades físicas. En este contexto, Zantye y colaboradores realizaron un estudio donde se sintetizan nanopartículas de HAp dopadas con Europio y Samario, concluyendo que debido a sus propiedades de biocompatibilidad, eficiencia de carga y emisión de fluorescencia en verde y rojo, tienen uso potencial en bioimagen y como agentes teragnósticos (Zantye et al., 2019).

1.4 Danio Rerio

El pez cebra (*Danio rerio*) es uno de los modelos experimentales más utilizados en biomedicina gracias a su pequeño tamaño, bajo costo de mantenimiento, fácil cuidado, alta fecundidad y maleabilidad genética. De acuerdo con los lineamientos éticos internacionales, es posible realizar estudios *in vivo* con este organismo hasta los primeros cinco días post-fertilización, permitiendo replicar los experimentos con medios relativamente simples. Así mismo, técnicas avanzadas como la microscopia confocal y la obtención de imágenes en time-lapse pueden ser utilizados en ejemplares vivos, dando la posibilidad de obtención

de imágenes de alta calidad, seguimiento de procesos celulares y monitoreo de efectos toxicológicos en tiempo real.

Además, una de las principales ventajas de este modelo radica en su utilidad para el cribado de fármacos y moléculas bioactivas. Estos compuestos pueden ser administrados de diversas maneras, como con la técnica de microinyección o la disolución directa en el agua de pecera (exposición oral), lo que permite evaluar sus efectos toxicológicos a gran escala de manera eficiente (Haque & Ward, 2018). Los lineamientos para las pruebas de toxicidad en embriones y larvas de pez cebra están establecidas por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) en la prueba No. 236, titulada “Prueba de toxicidad en agua en embriones de peces” (FET, por sus siglas en inglés) (OECD, 2025).

En particular, el pez cebra se ha posicionado como un modelo *in vivo* importante para la investigación de enfermedades óseas, debido a que su genoma comparte un 82% de similitud con el del ser humano en genes asociados a diversas patologías que afectan al sistema óseo, como son la osteoporosis, la osteoartritis y la osteogénesis imperfecta.

A diferencia de los mamíferos, cuya capacidad de regeneración ósea está limitada por la actividad de los osteoblastos y que a su vez se ve reducida por la vejez o debido a las lesiones de huesos largos, el pez cebra tiene la habilidad de regenerar varios de sus tejidos, incluyendo el hueso y las aletas, incluso después de una amputación, recobrando su tamaño, forma y patrón tisular original. La amputación de la aleta caudal es ampliamente utilizada gracias a que permite el estudio de los distintos mecanismos y vías de señalización asociados a la osteogénesis (Valenti et al., 2020).

Además, durante las etapas embrionarias y larvianas, los peces cebra presentan la característica de transparencia óptica, por lo que la actividad asociada a los osteoblastos y la osteogénesis puede monitorearse con gran detalle. Esta característica también posibilita la observación directa del flujo sanguíneo, debido a que el sistema vascular comienza a formarse a partir de las 22 horas post-fertilización (hpf), estableciendo una circulación funcional a las 24 hpf. Estudios genéticos han indicado que las principales vías de señalización involucradas en la biología vascular se conservan entre el pez cebra y los mamíferos, por lo que se respalda que los resultados obtenidos son potencialmente traducibles al ser humano.

Es por esto que, el pez cebra constituye una herramienta experimental valiosa para el estudio y desarrollo de estrategias terapéuticas referentes a las patologías del sistema óseo y el sistema vascular, así como para pruebas toxicológicas.

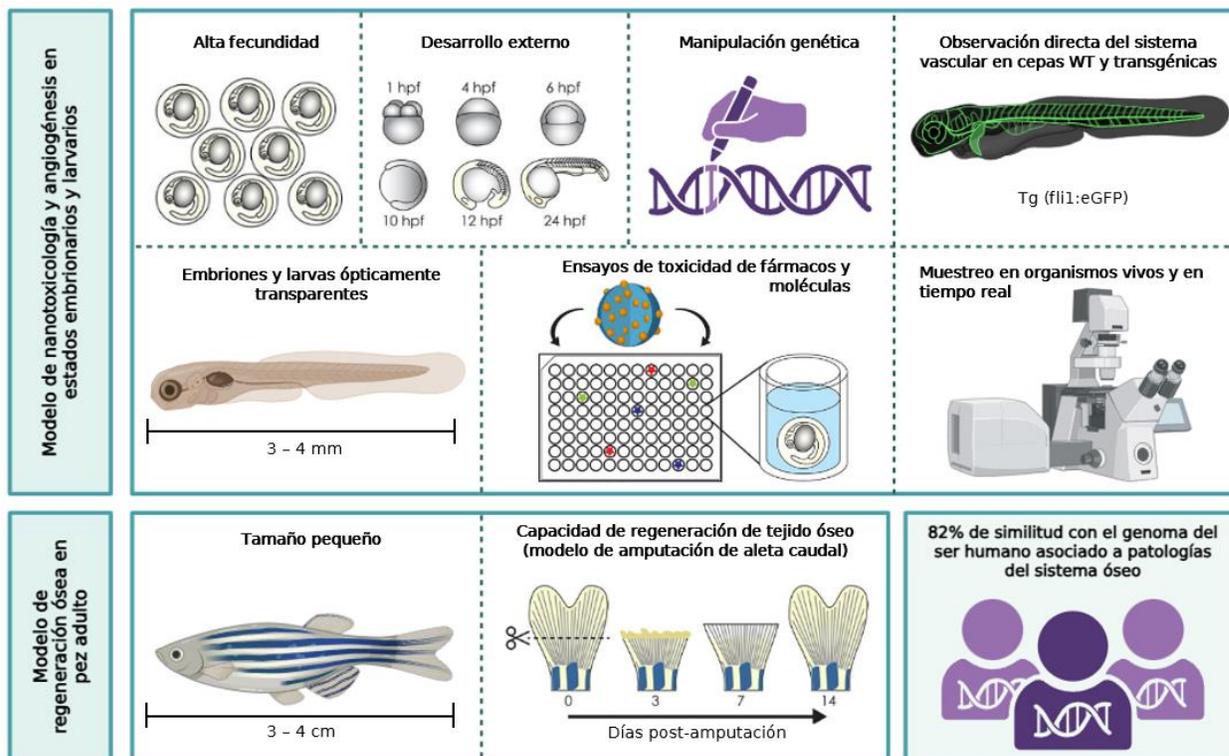


Figura 4. El pez cebra como modelo en regeneración ósea, angiogénesis y nanotoxicología. Esquema realizado en BioRender y modificado de Tonelli *et al*, 2020.

1.5 Hipótesis

Las nanopartículas de hidroxapatita dopadas con europio tendrán el potencial de estimular la regeneración y remodelación ósea, así como la angiogénesis.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Estudiar el potencial de nanopartículas luminiscentes de hidroxapatita dopadas con europio en el proceso

de regeneración ósea y angiogénesis *in vitro* y en un modelo *in vivo* de pez cebra.

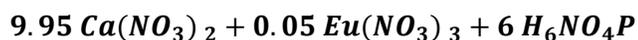
1.6.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas luminiscentes de hidroxiapatita dopadas con europio.
2. Evaluar *in vitro* el efecto en la viabilidad de células tratadas con nanopartículas luminiscentes de hidroxiapatita dopadas con europio.
3. Estudiar *in vitro* las capacidades de las nanopartículas luminiscentes de hidroxiapatita dopadas con europio para la generación de especies reactivas de oxígeno.
4. Evaluar *in vivo* los efectos en la viabilidad de los embriones y larvas de pez cebra tratados con nanopartículas luminiscentes de hidroxiapatita dopadas con europio.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Síntesis de nanopartículas luminiscentes

Se realizaron distintos métodos con el fin de sintetizar nanomateriales de hidroxiapatita (HAp) dopadas con iones trivalentes de Europio (HAp:Eu³⁺). La estequiometría de la reacción fue la siguiente:



Los precursores de la red anfitriona utilizados en todas las síntesis fueron nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, nitrato de Europio $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$, y fosfato de amonio $\text{H}_6\text{NO}_4\text{P}$, todos de la marca SIGMA-ALDRICH. La proporción de dopaje con Europio para las HAp:Eu³⁺ fue del 5% (Zavala-Sanchez et al., 2015). El horneado fue realizado en un horno Felisa FE-290, el secado y tratamientos térmicos fueron realizados en un horno THERMOLYNE F6018 de la marca Thermo Scientific.

2.1.1 Síntesis por combustión

Siguiendo la metodología de síntesis por combustión reportada por Zavala-Sánchez en 2015, fueron mezclados en un vaso de precipitados los precursores de la red anfitriona, así como el nitrato de Europio y el combustible, añadiendo 20 mL de agua desionizada. La mezcla se mantuvo en agitación magnética por un periodo de 15 minutos hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente, el producto fue horneado durante 15 minutos en una mufla industrial. Por último, se molió el producto resultante en un mortero ágata hasta obtener un polvo fino. Finalmente se le dio un tratamiento térmico.

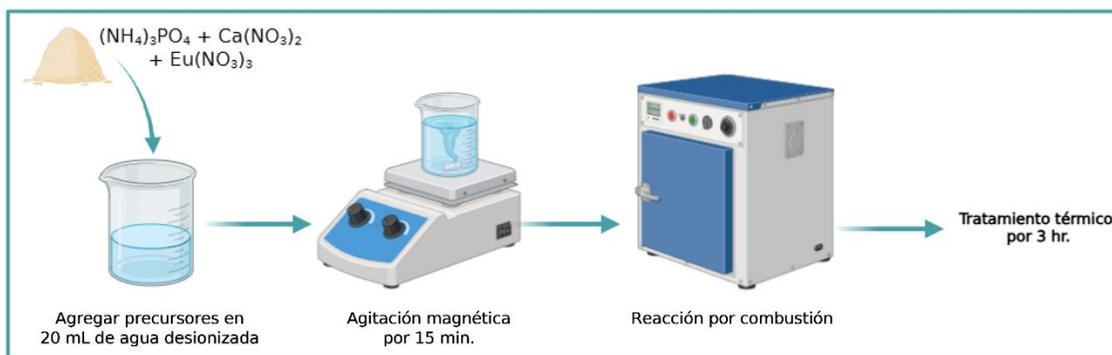


Figura 5. Esquema general de la síntesis por combustión para las HAp:Eu³⁺. Realizado en BioRender.

Con este método fueron realizadas tres síntesis, variando el tipo de combustible y la temperatura del tratamiento térmico. En la primera y segunda síntesis se utilizó como combustible la carbohidrazida y la solución con los precursores fue llevada al horno precalentado a 550°C hasta que ocurrió la reacción, posteriormente se les aplicó un tratamiento térmico final de 1100°C por una hora y 650°C por tres horas respectivamente. Para la tercera síntesis fue utilizado como combustible el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), basándose en la metodología reportada por Haghi en 2019. Para esta síntesis el horno fue precalentado a 250°C, posteriormente se introdujo la solución con los precursores hasta que ocurrió la reacción, y por último se le dio un tratamiento final de 650°C por 3 horas.

La fórmula para determinar la cantidad en gramos de combustible necesarios para generar la reacción de combustión fue la siguiente (Patil et al., 2008):

$$m_F = \frac{\varphi F_w}{M_T} \quad (1)$$

Donde, φ está dado por la división de las valencias ponderadas de los precursores entre el negativo de las valencias ponderadas del combustible, F_w es el peso molecular del combustible, M_T son los moles totales de la reacción y m_F el peso en gramos del combustible.

2.1.2 Síntesis hidrotermal

Se siguió la metodología propuesta por Liu en 2012 con algunas modificaciones. Se prepararon dos soluciones: la *Solución 1*, en un vaso de precipitados se agregó el precursor del fosfato para la red anfitriona en 20 mL de agua desionizada y se sometió a agitación constante por 15 minutos hasta obtener una mezcla homogénea; la *Solución 2*, en un vaso de precipitados se agregó el precursor del calcio de la red anfitriona y el Nitrato de Europio en 20 mL de agua desionizada y se sometió a agitación constante por 15 minutos hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente, a la *Solución 1* se le ajustó el pH con una solución de 2 M de NaOH a un valor de 12. La *Solución 2* fue agregada a goteo a la *Solución 1* bajo constante agitación, conservándose así por una hora hasta obtener una solución de consistencia lechosa, la cual fue introducida a la cámara hidrotermal y posteriormente al horno a 120°C por 24 horas. El producto obtenido fue lavado y centrifugado tres veces con agua desionizada y etanol. El material resultante se

sometió a secado a 80°C por 24 horas. Finalmente, el producto obtenido fue molido en un mortero ágata y se le dio un tratamiento térmico final (X. Liu et al., 2012).



Figura 6. Esquema general de la síntesis hidrotérmica para las HAp:Eu³⁺. Realizado en BioRender.

Con este método fueron realizadas tres síntesis. La primera con un tratamiento térmico a 650°C por tres horas. Para la segunda y tercer síntesis, fue modificada la *Solución 1* descrita con anterioridad al agregarle CTAB y mantenerla en agitación hasta obtener una solución homogénea, siguiendo la metodología empleada por Yang en 2008. Para la segunda síntesis no fue aplicado tratamiento térmico final. En la tercer síntesis, se dividió en tercios el producto obtenido y se le dio un tratamiento térmico distinto por 3 horas a cada grupo, de 200°C, 400°C y 500°C respectivamente.

2.2 Caracterización fisicoquímica de nanopartículas luminiscentes

Las propiedades fisicoquímicas y superficiales de los nanomateriales como lo son el tamaño, forma, cristalinidad, composición, luminiscencia, entre otras son de vital relevancia para la aplicación específica que se les quiere dar.

Por lo general, una sola técnica analítica no resulta suficiente para obtener toda la información necesaria para su estudio por lo que resulta fundamental combinar la información cualitativa y cuantitativa obtenidas mediante varias técnicas. La Tabla 1 integra y visualiza las diferentes técnicas para la evaluación de nanomateriales.

Tabla 1. Técnicas de caracterización de las propiedades de los nanomateriales. Tomada de Materiales y nanomateriales. Principios, aplicaciones y técnicas de caracterización (p. 44).

Propiedad caracterizada	Técnicas
Tamaño	Microscopía electrónica de transmisión, Microscopía electrónica de barrido, Difracción de rayos-X, Microscopía de fuerza atómica, UV-vis, Resonancia magnética nuclear, Dispersión dinámica de luz.
Forma	Microscopía electrónica de transmisión, Microscopía de fuerza atómica, Dispersión de luz elípticamente polarizada.
Composición química	Difracción de rayos-X, Espectroscopía de rayos-X, Espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente, Microscopía electrónica de barrido acoplada a rayos-X de energía dispersiva, Resonancia magnética nuclear.
Estructura cristalina	Difracción de rayos-X, Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución.
Estado de oxidación	Espectroscopía de fotoelectrones de rayos-X, Espectroscopia de absorción de rayos-X, Espectroscopia de Mosbauer.
Área de superficie	Resonancia magnética nuclear, Brunauer-Emmett-Teller.
Concentración	UV-vis, Espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente, Resonancia magnética nuclear, Sedimentación centrífuga diferencial.
Propiedades ópticas	UV-vis, Espectroscopia de fotoluminiscencia.
Carga superficial	Potencial zeta, Movilidad electroforética.

2.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido

El fundamento de esta técnica, más conocida como SEM por sus siglas en inglés (Scanning Electron Microscopy), radica en el bombardeo de un haz de electrones de alta energía emitidos por un filamento de tungsteno- Durante el barrido, la interacción de los electrones con la superficie genera electrones secundarios que son colectados mediante un detector, produciendo una imagen en escala de grises asociada a la topografía del analito.

Con esta técnica se obtuvieron imágenes de alta resolución para los nanomateriales sintetizados, con el fin de analizar en detalle sus características superficiales. La caracterización se llevó a cabo en la Unidad de Nanocaracterización del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, utilizando un SEM JEOL JSM-5400, el cual permite reducir la temperatura de la muestra hasta 100K.

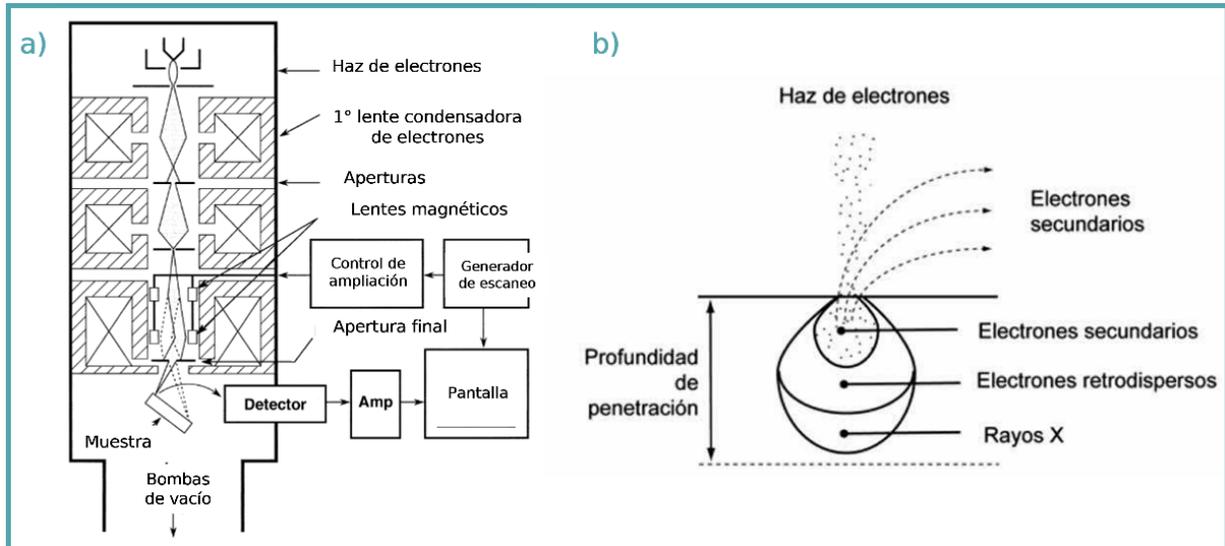


Figura 7. Esquema del SEM. a) Componentes de la columna de electrones del SEM, b) Interacción de un haz de electrones con un sólido en un microscopio electrónico de barrido. Modificado de Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis (p. 23) y Materiales y nanomateriales. Principios, aplicaciones y técnicas de caracterización (p. 114).

2.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión

La Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) funciona bajo un principio semejante al del microscopio convencional pero en lugar de luz, utiliza un haz de electrones de alta energía, esto le proporciona ventajas en cuanto a la resolución alcanzable (Sengar, 2017). En el TEM, un espécimen delgado es irradiado con un haz de electrones generado por un alto voltaje, entre 100-300 kV, estos atraviesan la muestra al ser direccionados mediante lentes electromagnéticas y se dispersan en función de la densidad, composición y estructura cristalina del material (Reimer & Kohl, 2008).

Con esta técnica se obtuvo información sobre la morfología, distribución de tamaños y distancias interplanares de los nanomateriales. Las muestras fueron resuspendidas en etanol y ultrasonificadas para su colocación sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono y su posterior análisis. Este estudio se realizó en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA)-CICESE en un TEM Hitachi 7500.

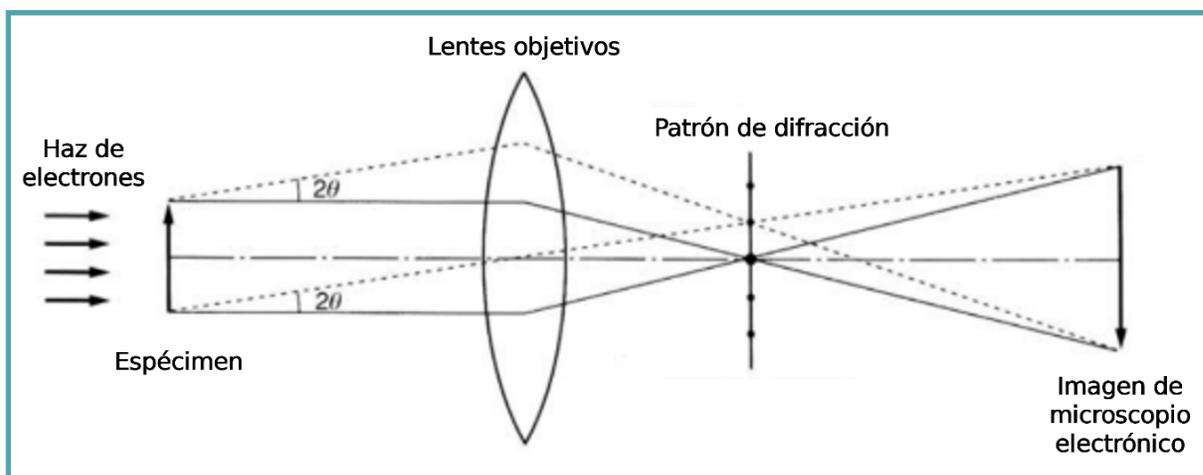


Figura 8. Esquema de formación de imágenes en un microscopio electrónico de transmisión (TEM). Los electrones generados y acelerados inciden en el espécimen. Al atravesar la muestra, algunos electrones pueden dispersarse con ciertos ángulos en función de su estructura atómica, densidad y orientación cristalina. El haz transmitido es enfocado por las lentes electromagnéticas objetivas. En el plano focal posterior se concentran los haces difractados formando un patrón de difracción, el cual proporciona información del ordenamiento cristalino de la muestra. Finalmente, el TEM puede proporcionar una imagen con información de la morfología y estructura del espécimen. Modificado de High-Resolution Electron Microscopy for Materials Science, página 2 (Shindo & Hiraga, 1998).

2.2.3 Análisis Brunauer, Emmett and Teller (BET)

El análisis BET, por las siglas de sus autores Brunauer, Emmet y Teller, es una técnica de caracterización utilizada para determinar el área superficial de un material sólido. Esta técnica, desarrollada en 1938, se basa en la adsorción física (fisisorción) de un gas a bajas temperaturas (77 K) en múltiples capas sobre la superficie de un sólido con el fin de determinar el área superficial (m^2/g) del material en función de la cantidad de gas adsorbido a distintas presiones relativas.

$$\frac{1}{v \left[\frac{P_0}{P} \right] - 1} = \frac{C - 1}{v_m C} \cdot \frac{P}{P_0} + \frac{1}{v_m C} \quad (2)$$

Donde v es el volumen de gas adsorbido, v_m es el volumen de la monocapa, P es la presión de equilibrio, P_0 es la presión de saturación del gas y C es la constante relacionada con la energía de adsorción (Rouquerol et al., 1994).

Esta técnica fue empleada para la determinación del área superficial de los nanomateriales sintetizados. Las muestras fueron previamente desgasificadas a 300°C en condiciones de bajo vacío durante 8 horas. Posteriormente, la determinación del área superficial se obtuvo en el equipo Micrometric TriStar II

utilizando nitrógeno líquido a -195.8°C . El diámetro promedio del poro y el volumen del poro fueron calculados mediante las isothermas de desorción utilizando el método de Barrer, Joyner y Halenda (BJH).

2.2.4 Difracción de Rayos-X

El principio de la Difracción de Rayos-X (XRD, por sus siglas en inglés) se basa en la segunda ley de Bragg y opera al incidir un rayo-X monocromado, generado cuando un haz de electrones es producido por el calentamiento de un filamento de Tungsteno y acelerado hacia un ánodo mediante la aplicación de una diferencia de potencial. Se hace incidir el rayo-X sobre la muestra, propiciando la difracción del rayo en ángulos específicos (2θ) en función de la composición y estructura cristalina del analito. Los rayos difractados son colectados por un detector y son graficados en función de su intensidad versus ángulo de difracción, lo que se conoce como difractograma.

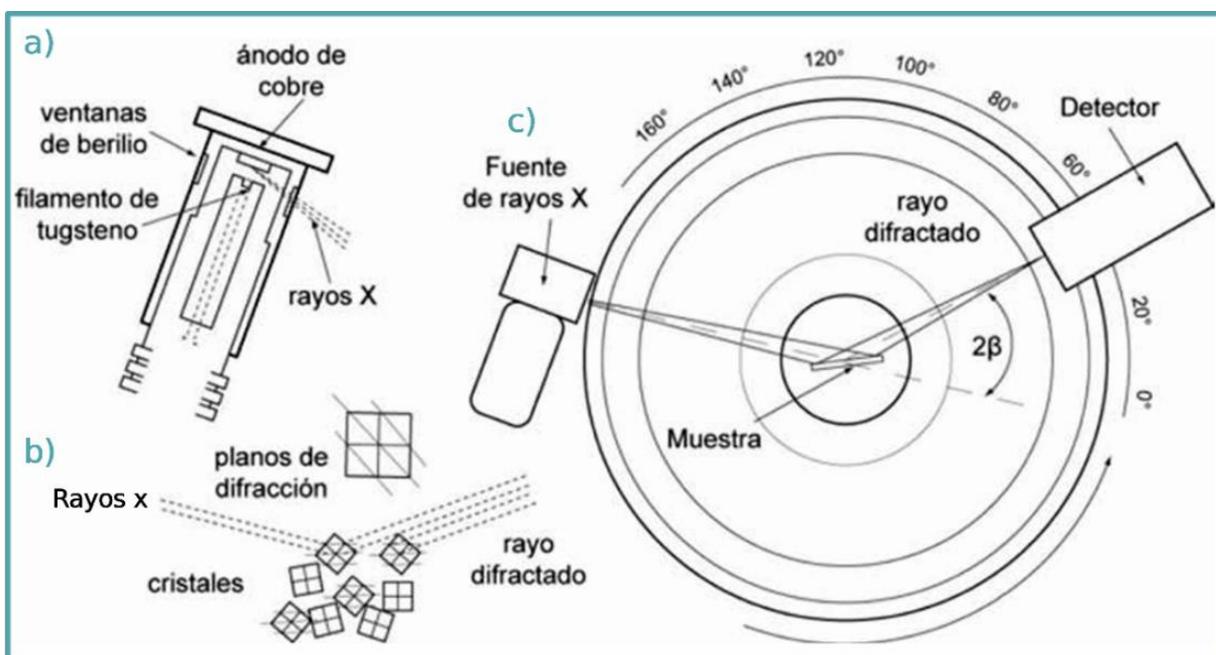


Figura 9. Esquema del XRD. a) Estructura de la fuente de rayos-X dentro de la estructura de vidrio en forma de tubo. b) Efecto de la interacción de los rayos-X con un material cristalino. c) Esquema general de los componentes principales de un difractómetro de rayos-X: fuente, portamuestras y detector. Tomado de Materiales y nanomateriales. Principios, aplicaciones y técnicas de caracterización (p. 49).

La difracción de rayos-X (XRD), es útil para analizar la estructura cristalina de las HAp:Eu³⁺. Este estudio fue realizado en la Unidad de Nanocaracterización del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM con un difractómetro Philips X'Pert MPD, haciendo un escaneo del rango de 2θ de 10 a 90° .

El tamaño promedio de la estructura cristalina se estimó mediante la medición del ancho de los picos del XRD, siguiendo la ecuación de Scherrer:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (3)$$

Donde k es la constante dependiente de la forma del cristalito, con un valor de 0.89 para la HAp, λ es a longitud de onda del XRD, con un valor de 0.154050 nm, β corresponde a la mitad del ancho del pico de difracción más pronunciado y θ es el ángulo de difracción.

2.2.5 Espectroscopía de Dispersión de Energía

La espectroscopía de dispersión de energía (EDS) se realiza con un SEM cuando el haz de electrones que incide en la muestra produce la excitación de electrones internos del material, así cuando éstos caen desde las capas más externas se emite un fotón de rayos-X con una energía característica para cada elemento. Por último el detector mide la energía y cantidad de fotones.

Esta técnica se realizó con el objeto de identificar la composición química de los nanomateriales. Este estudio se llevó a cabo en la Unidad de Nanocaracterización del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, utilizando un SEM JEOL JSM-5400.

2.2.6 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), consiste en un haz de radiación infrarroja (IR) es dirigido a través de una pastilla de bromuro de potasio (KBr), el cual contiene la muestra a analizar (fase sólida). Una parte de la radiación es absorbida y el resto es transmitida, la radiación transmitida es recibida en un detector con el fin de graficar la adsorción o transmisión con respecto a la longitud de onda o frecuencia de la IR. La absorción de la IR nos proporciona información sobre la estructura molecular, asociada a las frecuencias de vibración de los enlaces atómicos, y el tamaño de los picos es proporcional a la concentración. Debido a que cada material tiene una composición y arreglo único de átomos, dos materiales nunca producen el mismo espectro IR, por lo tanto el FTIR constituye una huella digital de los nanomateriales (Efrén & Yumi, 2022).

Los estudios se realizaron en el espectrómetro Alpha II, con un rango espectral de 400 a 4000 cm^{-1} y resolución espectral de 2 cm^{-1} con el fin de obtener las vibraciones moleculares correspondientes a las HAp:Eu³⁺(5%).

2.2.7 Fotoluminiscencia

Los espectros de fotoluminiscencia (PL), tanto de emisión como de excitación, fueron medidos con un espectrofluorómetro de la marca Hitachi modelo F-7000, equipado con una lámpara de arco de Xenón de 150 W y una apertura de 5 nm.

En primer lugar, se obtuvo el espectro de emisión utilizando una longitud de excitación inicial de 254 nm, realizando un barrido en el intervalo de 450 a 750 nm para detectar la intensidad de emisión en función de la longitud de onda. Posteriormente, la longitud de onda correspondiente a la máxima intensidad de emisión se fijó como referencia para la adquisición del espectro de excitación, el cual se registró mediante un barrido en el rango de 200 a 450 nm. De esta manera, ambos espectros permitieron llevar a cabo la caracterización óptica del material.

2.2.8 Catodoluminiscencia

Los espectros de catodoluminiscencia (CL) fueron obtenidos mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM), al incidir un haz de electrones en la muestra éstos transfieren energía a los electrones del material excitándolos, al relajarse estos electrones emiten fotones que son posteriormente detectados mediante un sistema óptico acoplado al SEM.

Este estudio complementó la caracterización óptica de los nanomateriales sintetizados. Fue realizado en la Unidad de Nanocaracterización del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM con un SEM JEOL JSM-5400.

2.3 Ensayos *in vitro*

2.3.1 Líneas celulares

Se cultivaron células de preosteoblastos de ratón MC3T3-E1 en medio α -MEM, así como células epiteliales 293T humanas en medio DMEM, los medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino. También, se cultivó la línea celular de fibroblastos humanos HFF-1 en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 15%. Todas las líneas celulares se mantuvieron en incubación a 37°C con 5% de CO₂.

2.3.2 Ensayo de viabilidad celular

El ensayo MTT, ensayo de tetrazolio de metiltiazol, es una prueba colorimétrica utilizada para evaluar la viabilidad y proliferación celular mediante su actividad metabólica. La capacidad mitocondrial de las células metabólicamente activas reducirán el MTT a formazán, un compuesto insoluble de color púrpura, cuya concentración es directamente proporcional a la cantidad de células viables (Sengar, 2017).

Mediante este ensayo, se evaluó la citotoxicidad en las líneas celulares de preosteoblastos MC3T3-E1 y células epiteliales 293T al ser expuestas a distintas concentraciones de las HAp:Eu³⁺ sintetizadas: nanopartículas y nanorods.

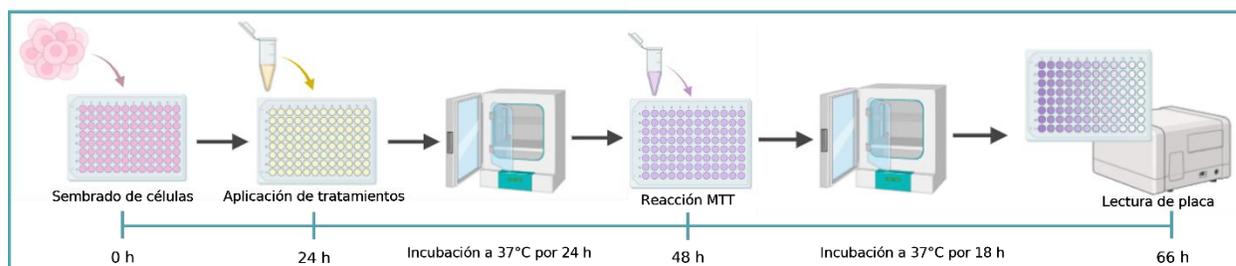


Figura 10. Esquema del ensayo de viabilidad celular. Se realiza el sembrado de células en placas de 96 pozos a las 0 horas. A las 24 horas se aplican los tratamientos con nanopartículas y nanorods respectivamente, incubándolas a 37°C por 24 horas. Posteriormente es agregado el reactivo MTT, dejándose la placa en incubación a 37°C por 18 horas. Por último, se realiza la lectura de la absorción de la placa en un espectrofotómetro a 570 nm. Realizado en BioRender.

Las células a estudiar se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad celular del 70%, correspondiente a 7'500 células por pozo para la línea MC3T3-E1 y a 14'000 células por pozo para la línea 293T. Se

mantuvieron en incubación por 24 horas a 37°C con 5% CO₂, posteriormente se le retiró el medio de cultivo, sustituyéndolo por medio fresco con las distintas concentraciones de HAp:Eu³⁺: nanopartículas y nanorods respectivamente. Las concentraciones utilizadas fueron 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781 µg/mL, preparadas inicialmente en 5% de DMSO en PBS. Se mantuvieron en incubación nuevamente por 24 horas a 37°C con 5% CO₂. Después, se le añadió 20 µL por pozo de solución de MTT y se incubó la placa por 5 horas en las mismas condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, la reacción fue detenida con 100 µL de buffer de lisis por pozo, preparado con 0.01M HCl en SDS al 10%. Se incubaron las células por 18 horas en las condiciones descritas anteriormente. Por último, se midió la placa en un espectrofotómetro EPOCH a 570 nm. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado con sus respectivos grupos control.

2.3.3 Ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno

Con el fin de medir la potencial generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) asociadas a las nanopartículas y nanorods de HAp:Eu³⁺, se realizaron experimentos *in vitro* sin y en presencia de células empleando reactivos sensibles a la presencia de oxígeno: DPBF de la marca Sigma-Aldrich, altamente sensible a la presencia de O₂, el cual al oxidarse presenta una disminución en su espectro de absorbancia (Entradas et al., 2020); y CellROX Deep Red de la marca Thermo Fisher Scientific, sensible ante el estrés oxidativo, el cual presenta fluorescencia tras oxidarse.

2.3.3.1 Ensayo con reactivo DPBF sin presencia de células

La medición de la potencial generación de ROS se llevó a cabo mediante un ensayo utilizando el reactivo 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) como sonda molecular, el cual es un compuesto que presenta disminución en su absorbancia debido a la presencia de oxígeno al ser excitado con una longitud de onda de 410 nm (Sengar et al., 2018).

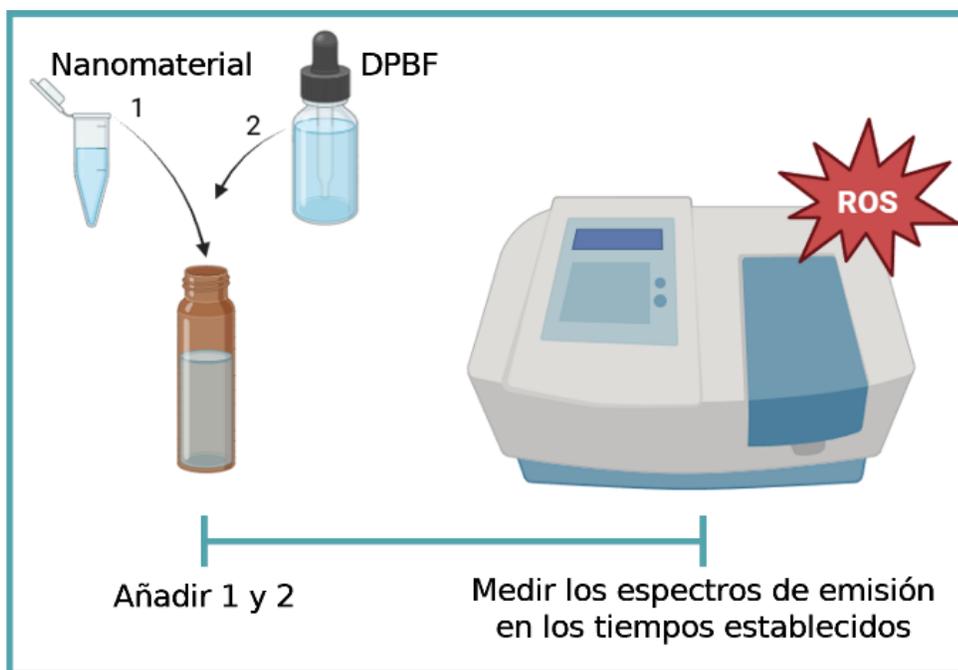


Figura 11. Esquema del ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno usando DPBF. El esquema muestra la preparación de las diluciones de nanomateriales adicionando el reactivo DPBF a 10 mM en frascos oscuros para evitar la fotodegradación de la solución. Los espectros de emisión de las soluciones fueron medidas en una celda de cuarzo con un espectrofluorómetro. Realizado en BioRender.

Para la preparación de las soluciones, se elaboró una solución stock de DPBF a 0.5 mM en metanol, almacenada en un frasco ámbar para evitar su degradación por exposición de la luz. Posteriormente, se prepararon diluciones de nanopartículas y nanorods de HAp:Eu³⁺ a concentraciones finales de 25, 12.5 y 3.125 µg/mL en PBS. Posteriormente, las soluciones para el ensayo se prepararon en frascos oscuros, adicionando DPBF hasta alcanzar una concentración final de 10 mM junto con las distintas concentraciones de nanopartículas y nanorods. Se incluyó un grupo control, el cual consistió en la solución de DPBF a 10 mM en PBS. Se tomaron los espectros de emisión con una longitud de onda de excitación de 410 nm, en el rango de 420 a 600 nm, en el espectrofluorómetro de la marca Hitachi modelo F-7000, al ingresar las soluciones en una celda de cuarzo. Las mediciones fueron realizadas en dos esquema experimentales: el primero, tomando los espectros de emisión a los 0, 30, 60 y 120 minutos; en el segundo, las mediciones fueron realizadas cada 5 minutos durante un periodo de 30 minutos.

Por último, la intensidad máxima obtenida de cada curva fue graficada en función del tiempo, con el propósito de observar el comportamiento de degradación del reactivo DPBF como indicador de la generación de ROS.

2.3.3.2 Ensayo con reactivo CellRox Deep Red en presencia de células

En este ensayo, la línea celular de fibroblastos humanos HFF-1 fue expuesta a distintas concentraciones de HAp:Eu³⁺ sintetizadas: nanopartículas y nanorods, con el fin de medir la potencial generación de ROS mediante imagenología confocal. El reactivo CellROX es un colorante no fluorescente en su estado reducido, sin embargo presenta fluorescencia tras su oxidación debido a la generación de ROS, presentando niveles máximos de absorción/emisión en 644 y 665 nm (Thermo Fisher Scientific, 2010).

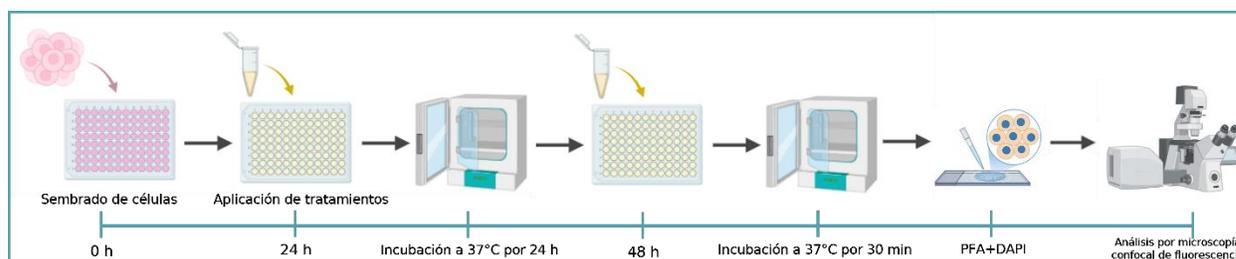


Figura 12. Esquema del ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno utilizando el reactivo CellROX Deep Red. Se realiza el sembrado de células en placas de 96 pozos a las 0 horas. A las 24 horas se aplican los tratamientos con nanopartículas y nanorods respectivamente, incubándolas a 37°C por 24 horas. Posteriormente es agregado el reactivo DPBF, dejándose la placa en incubación a 37°C por 30 minutos. A continuación, se agrega PFA para fijar las células, así como colorante DAPI para la tinción de los núcleos celulares. Por último, se realiza el análisis de la placa por microscopía confocal. Realizado en BioRender.

Primero, se sembraron células HFF-1 en una placa de 96 pozos a una densidad celular del 80%. Se mantuvieron en incubación por 24 horas a 37°C con 5% CO₂, posteriormente se le retiró el medio de cultivo, sustituyéndolo por medio fresco con las distintas concentraciones de HAp:Eu³⁺: nanopartículas y nanorods respectivamente. Las concentraciones utilizadas fueron 100, 50, 25 µg/mL, preparadas inicialmente en 5% de DMSO en PBS. Se mantuvieron en incubación nuevamente por 24 horas a 37°C con 5% CO₂. Después, se le añadió el reactivo CellROX Deep Red a 5 µM preparado en el medio completo. Posteriormente, la placa fue incubada por 30 minutos en las condiciones descritas anteriormente. Después, se retiró el medio y se hicieron tres lavados con PBS 1X. Finalmente, se fijaron las células con PFA a 3.7% por 15 minutos y se tiñeron los núcleos celulares utilizando el colorante DAPI a 0.1 µg/mL por 10 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó microscopía confocal para la obtención de imágenes por cada pozo de células tratadas y sus controles. El experimento se realizó por triplicado.

El microscopio confocal empleado fue de la marca Leica, modelo TCS SP8 STED 3X-FALCON, utilizando una longitud de onda de excitación de 405 nm (diodo) con un filtro de emisión de 430-470 nm para observar los núcleos celulares y una longitud de onda de excitación de 644 nm con un filtro PMT de emisión de 660-

720 nm para observar la fluorescencia del reactivo en el canal 1, la transmisión en el canal 2 y la fluorescencia de los núcleos celulares en el canal 3.

2.3.3.3 Microscopio confocal

El microscopio confocal escanea una muestra punto a punto mediante el uso de un láser, es decir un haz luminoso convergente enfocado sobre el plano del objeto que se desea observar. Presenta la principal ventaja de lograr resoluciones superiores al microscopio óptico común, especialmente si el objeto a observar presenta fluorescencia, aunado a esto posee las ventajas de mejorar la relación señal-ruido, la reducción del desenfoque de la imagen por dispersión de la luz, y la inclusión de un escaneo en los ejes x-y-z (Pawley, 2006).

En un microscopio ordinario, si se enfoca el microscopio en el plano del objeto que se desea observar, los demás elementos del objeto a diferentes profundidades se verán desenfocados y la imagen global observada estará muy reducida en contraste. La meta entonces es eliminar la luz de esos planos desenfocados, aumentando al mismo tiempo el contraste. Este tipo de microscopio fue inventado por Marvin Minsky en 1957, pero debido a falta de desarrollo tecnológico no se pudo hacer una realidad hasta finales del siglo XX. (Malacara, 2015).

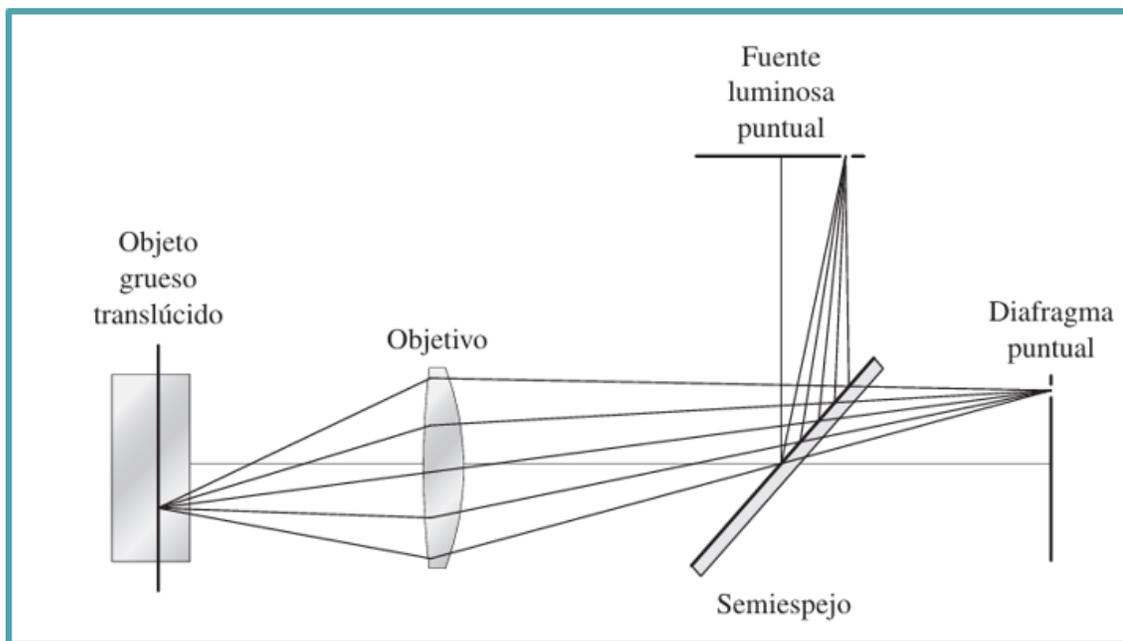


Figura 13. Esquema básico de un microscopio confocal. En este esquema se muestra que sólo la luz enfocada en la muestra puede pasar a través del diafragma puntual. Tomado de Óptica básica (p. 147).

Una variación es la técnica de excitación por dos fotones, proceso conocido con el nombre “two photon excited fluorescence” (TPEF), en el cual dos fotones de menor energía son absorbidos de manera simultánea por una molécula fluorófora para alcanzar el estado excitado, así en comparación con la microscopia confocal convencional, la microscopía de dos fotones permite obtener imágenes de planos mucho más profundos en el tejido a analizar, minimizando el daño al espécimen producido por la luz (Pawley, 2006).

2.4 Ensayos *in vivo*

2.4.1 Condiciones del sistema, reproducción y crecimiento del pez cebra

Los peces cebra se mantuvieron bajo condiciones controladas de nitratos, nitritos, amoníaco, pH, temperatura, dureza general y dureza carbonatada del agua del sistema. El acuario consta de un sistema abierto donde el agua es filtrada mediante bacterias nitrificantes, es decir un biofiltro, con el fin de mantener un ambiente sano y estable al descomponer los desechos generados por los peces y los restos de comida, beneficiando la reducción del estrés y enfermedades en la colonia, así como la reducción de la frecuencia de recambios de agua. Estos parámetros fueron monitoreados, al medirse con un kit para agua dulce modelo FRESHWATER MASTER TEST KIT de la marca API®, así como el kit GH & KH de la misma marca.

Las reproducciones se realizaron en proporción 1:2 de hembras y machos respectivamente, alimentándose con hojuela molida de la marca Tetra® y artemia de la marca OCEAN STAR INTERNATIONAL a partir del quinto día post-fertilización (dpf) y hasta la adultez, con una frecuencia de dos veces por día. El acuario mantiene un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Para los ensayos realizados, se utilizaron las cepas wild type (WT) y Tg (fli1:eGFP).

2.4.2 Ensayo de toxicidad en embriones y larvas

Con la finalidad de observar los posibles efectos tóxicos de las HAp:Eu³⁺ sintetizadas, se realizaron pruebas de toxicidad en embriones y larvas de pez cebra recién eclosionadas basándose en los lineamientos de la prueba No. 236 “Prueba de toxicidad en agua en embriones de peces”, FET por sus siglas en inglés, de la

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD). Los efectos a considerar fueron: coagulación de embriones, ausencia de formación de somitas, ausencia del desprendimiento de la cola del saco vitelino, ausencia de latido cardiaco, malformaciones generales y efectos en el sistema vascular: zonas con ausencia o aumento en la vascularización.

2.4.2.1 Exposición oral

Se expusieron a embriones de pez cebra con y sin corion, en las primeras horas post-fertilización (hpf), específicamente presentado un estado de epibolia entre el 30% y 50%, así como a larvas recién eclosionadas (48 hpf), a distintas concentraciones de nanopartículas porosas y nanorods en medio E3. Las concentraciones utilizadas fueron 100, 50, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, al 5% de DMSO en medio E3. Los embriones y larvas fueron mantenidos en placas de 24 pozos y en incubación a 37°C para su observación hasta las 96 hpf. Para los embriones descorionados, se agregaron 100 μL de agarosa al fondo de los pocillos y fueron manipulados con material de vidrio para preservar su integridad

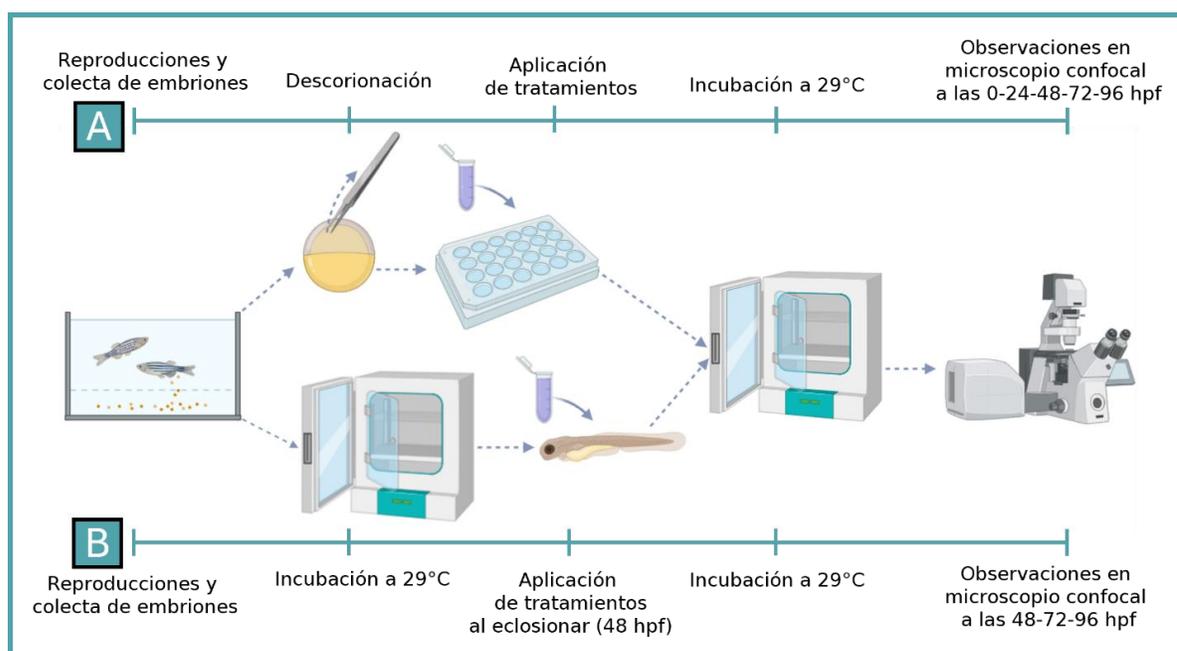


Figura 14. Esquema del experimento de toxicidad mediante exposición oral en embriones y larvas de pez cebra. Parte A) del experimento: tras la reproducción en proporción 1:2, H:M, se colectan los huevos fecundados. Se procede a descorionar los embriones mediante pinzas quirúrgicas bajo el estereoscopio al 30-50% de epibolia. Se aplicaron los tratamientos con las HAp:Eu³⁺ y se mantuvieron en incubación a 29°C para su continuo monitoreo y observación bajo el microscopio confocal hasta las 96 hpf. Parte B) del experimento: tras la reproducción en proporción 1:2, H:M, se colectan los huevos fecundados y se mantienen en incubación a 29°C hasta que las larvas eclosionen de manera natural (48 hpf). Las larvas recién eclosionadas son tratadas con las HAp:Eu³⁺ y posteriormente, se mantuvieron en incubación a 29°C para su continuo monitoreo y observación bajo el microscopio confocal hasta las 96 hpf. Esquema realizado en BioRender.

Para la adquisición de imágenes, se utilizó el microscopio de epifluorescencia y el microscopio confocal con una longitud de onda de excitación de 405 nm (LED) y un filtro PMT de 415-650 nm con el fin de observar la fluorescencia de las HAp:Eu³⁺ en el canal 3 y una longitud de onda de excitación de 488 nm y un filtro PMT de 500-550nm con el fin de observar la fluorescencia de la cepa Fli en el canal 4.

2.4.2.2 Microinyección

Se realizó la microinyección de las HAp:Eu³⁺: nanopartículas y nanorods, a las concentraciones de 100 µg/mL y 1 mg/mL en DMSO, en embriones de pez cebra en las primeras 3 hpf y a las 22 hpf, con el fin de observar posibles efectos toxicológicos y en la vasculatura mediante el uso de microscopía de fluorescencia. Los embriones y larvas fueron mantenidos en placas de 24 pozos y en incubación a 29°C para su observación hasta las 96 hpf.

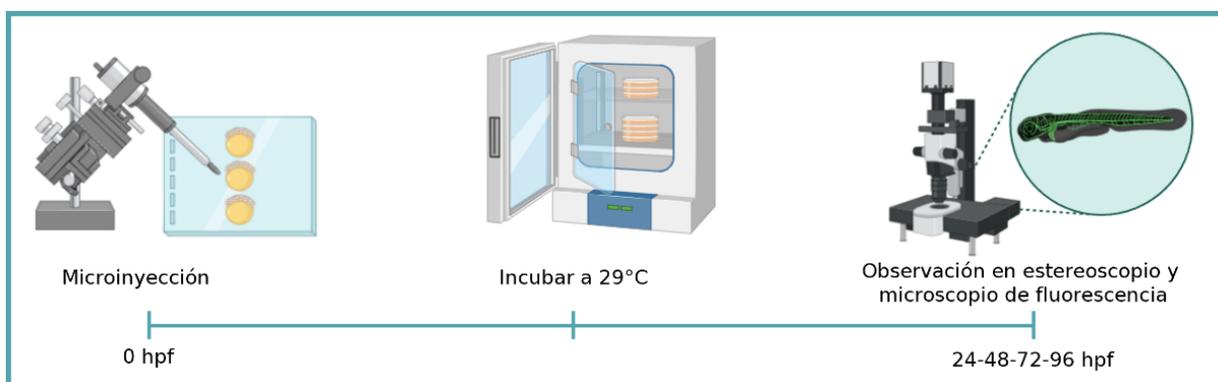


Figura 15. Esquema del experimento de toxicidad mediante la técnica de microinyección. La microinyección es realizada con micro agujas manufacturadas artesanalmente, los embriones son colocados sobre un colchón de agarosa sobre un canal con el fin de evitar el movimiento de estos al someterse a altas presiones cuando la aguja penetra el corión. La microinyección fue realizada en las primeras 3 hpf para el primer grupo y a las 22 hpf para un segundo grupo, periodo asociado al inicio de la formación del sistema vascular. Los grupos se mantuvieron bajo incubación para su monitoreo y observación en estereoscopio y microscopio de fluorescencia hasta las 96 hpf. Esquema realizado en BioRender.

2.5 Análisis Estadístico

Una vez comprobada la normalidad y la homogeneidad de la varianza de los datos obtenidos, mediante la prueba Shapiro-Wilk y la prueba de Levene respectivamente, se realizó un ANOVA de una vía para evaluar el efecto de los tratamientos a distintas concentraciones de HAp:Eu³⁺ en la viabilidad de las células, así como la relación entre las concentraciones y la generación de especies reactivas de oxígeno, en ausencia

y presencia de células. Las diferencias significativas entre tratamientos y sus respectivos grupos controles se identificó mediante la prueba *a posteriori* de Dunnett.

Para el análisis de las réplicas en conjunto de los ensayos de toxicidad en el pez cebra se realizó la prueba no paramétrica Scheirer-Ray-Hare, con el fin de determinar el efecto del tiempo-concentración-HAp:Eu³⁺ en la tasa de supervivencia de los embriones y las larvas tratadas. Tras la prueba, no se obtuvieron diferencias significativas en la interacción de los factores, sin embargo al analizar los factores por separado se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración de los tratamientos mediante la prueba Kruskal-Wallis y la prueba *post hoc* Dunn. Posteriormente, para el análisis por réplica se realizó un Kruskal-Wallis y al encontrar diferencias significativas la prueba *post hoc* Dunn.

El Scheirer-Ray-Hare se realizó mediante el software R, los demás análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8. Fue considerado un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. En las figuras, las diferencias significativas se indican con asteriscos: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Síntesis de nanopartículas luminiscentes

Con el objetivo de obtener nanomateriales luminiscentes de hidroxiapatita dopada con 5% de europio, se realizaron un total de ocho síntesis por los métodos de combustión e hidrotermal. Las variaciones referentes al uso de precursores, método de síntesis, tipo de combustible, temperatura de tratamiento térmico y nomenclatura son especificados en la Tabla 2.

Tabla 2. HAp:Eu³⁺: precursores, métodos de síntesis, combustible, tratamiento térmico y nomenclatura. Resumen del total de las síntesis realizadas por los métodos de combustión e hidrotermal con sus respectivos precursores, combustible de ser el caso, temperatura y tiempos de tratamiento térmico final.

Precursores	Método de síntesis	Combustible	Tratamiento térmico	HAp:Eu ³⁺ -[método de síntesis]-[agente o tratamiento]
Nitrato de calcio + fosfato de amonio + Nitrato de Europio	Combustión	Carbohidrazida	1100°C por 1 hora	HAp:Eu ³⁺ -CB-CH1100
Nitrato de calcio + fosfato de amonio + Nitrato de Europio + CTAB	Hidrotermal	N.A.	650°C por 3 horas	HAp:Eu ³⁺ -HT-CTAB650
Nitrato de calcio + fosfato de amonio + Nitrato de Europio	Combustión	CTAB	650°C por 3 horas	HAp:Eu ³⁺ -CB-CTAB650
Nitrato de calcio + fosfato de amonio + Nitrato de Europio	Combustión	Carbohidrazida	650°C por 3 horas	HAp:Eu ³⁺ -CB-CH650
Nitrato de calcio + fosfato de amonio + Nitrato de Europio	Hidrotermal	N.A.	Sin tratamiento térmico	HAp:Eu ³⁺ -HT
Nitrato de calcio + fosfato de amonio + Nitrato de Europio	Hidrotermal	N.A.	200°C por 3 horas	HAp:Eu ³⁺ -HT-200
Nitrato de calcio + fosfato de amonio + Nitrato de Europio	Hidrotermal	N.A.	400°C por 3 horas	HAp:Eu ³⁺ -HT-400
Nitrato de calcio + fosfato de amonio + Nitrato de Europio	Hidrotermal	N.A.	500°C por 3 horas	HAp:Eu ³⁺ -HT-500

Por motivos de claridad, las muestras se designarán a lo largo del documento como HAp:Eu³⁺-[método de síntesis]-[agente y/o tratamiento], donde 'CB' indica método de combustión, 'HT' síntesis hidrotérmal, 'CH' carbohidrazida y 'CTAB' bromuro de cetiltrimetilamonio.

Para visualizar los materiales obtenidos se tomaron fotografías de las muestras de HAp:Eu³⁺ al ser expuestas a una lámpara UV de 254 nm en un cuarto oscuro. Las imágenes fueron tomadas mediante un Galaxy S24 con una cámara de 12 MP, un ISO fijo de 200, velocidad de obturación de 1/20 s, apertura fija, balance de blancos de 5000K y compensación ev de -2.0.

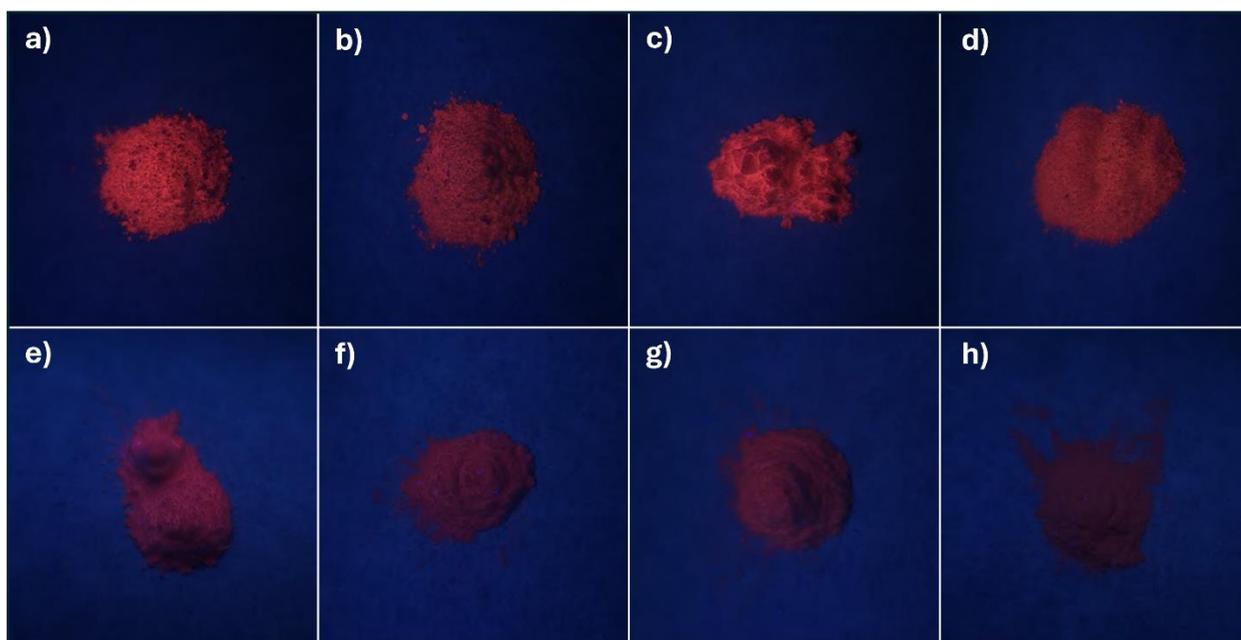


Figura 16. Fotografías correspondientes a las HAp:Eu³⁺. a) HAp:Eu³⁺-CB-CH1100, b) HAp:Eu³⁺-HT-CTAB650, c) HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650, d) HAp:Eu³⁺-CB-CH650, e) HAp:Eu³⁺-HT, f) HAp:Eu³⁺-HT-200, g) HAp:Eu³⁺-HT-400, h) HAp:Eu³⁺-HT-500. Se observó luminiscencia para todas las síntesis al ser excitadas con una lámpara UV de 254 nm.

En general, se observa en todas las síntesis de HAp:Eu³⁺ una emisión característica en tonos rojizos asociada a la excitación del ion Eu³⁺. El análisis cuantitativo se presenta en los espectros de fotoluminiscencia y catodoluminiscencia posteriormente.

3.1.1 Síntesis por combustión

Las síntesis por combustión tiene la característica de una reacción rápida en comparación con otros métodos, así mismo debido a las altas temperaturas son obtenidos materiales de alta pureza y

cristalinidad, lo cual es crucial para lograr una luminiscencia óptima. Por este método, se seleccionó la HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650, denominada a continuación como ‘nanopartículas’, como candidato con el fin de realizar los experimentos *in vitro* e *in vivo*.

3.1.2 Síntesis hidrotermal

Las síntesis por la técnica hidrotermal permite ajustar con precisión la temperatura y la presión, promoviendo la formación de nanomateriales altamente cristalinos, proporcionando ventajas en la incorporación uniforme a la matriz anfitriona de los dopantes. Por este método, se seleccionó la HAp:Eu³⁺-HT, denominada a continuación como ‘nanorods’, como candidato con el fin de realizar los experimentos *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Caracterización fisicoquímica de nanopartículas luminiscentes

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las caracterizaciones fisicoquímicas para los nanomateriales HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650 (nanopartículas) y HAp:Eu³⁺-HT (nanorods). Los resultados para los demás materiales sintetizados se anexan al final del documento.

3.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido

Con el fin de obtener información acerca de la superficie de los nanomateriales sintetizados, se obtuvieron micrografías de alta resolución por SEM.

Los resultados presentados en la Figura 17 muestran partículas grandes en ambas muestras, nanopartículas y nanorods, de rangos superiores a los 5 μm , así como una superficie irregular.

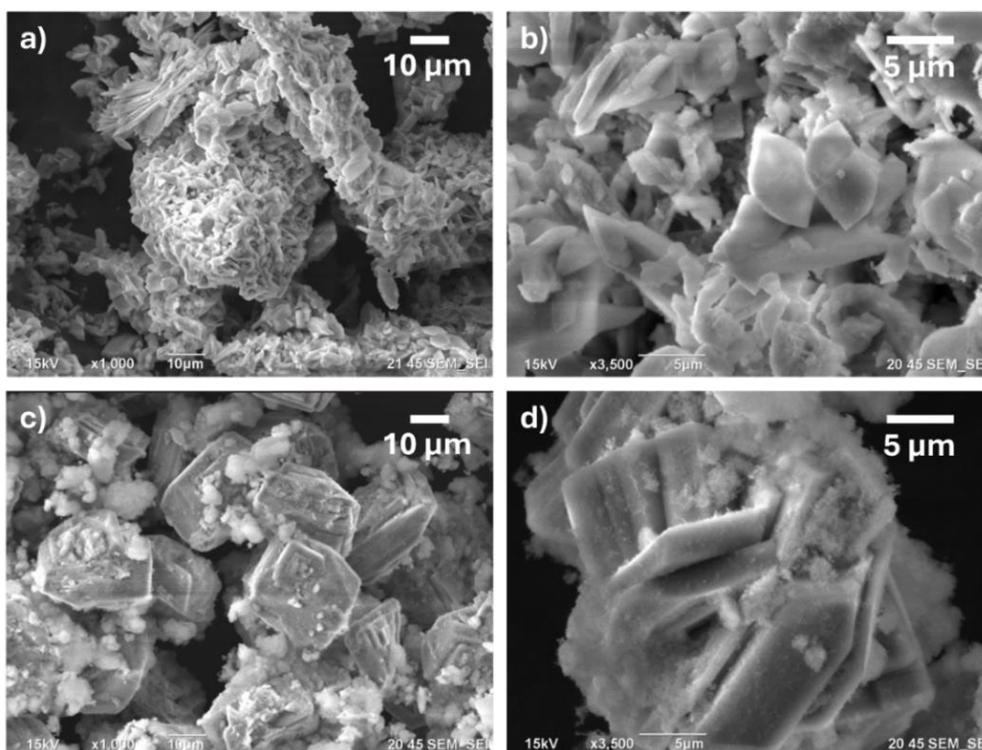


Figura 17. Imágenes SEM correspondientes a las muestras de HAp:Eu³⁺ a) nanopartículas HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650, b) imagen amplificada de a), c) nanorods HAp:Eu³⁺-HT, d) imagen amplificada de c).

3.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión

Las imágenes TEM se realizaron con el fin de obtener información acerca de la morfología, distribución de tamaños para los nanomateriales. Estos resultados fueron analizados en el programa Fiji.

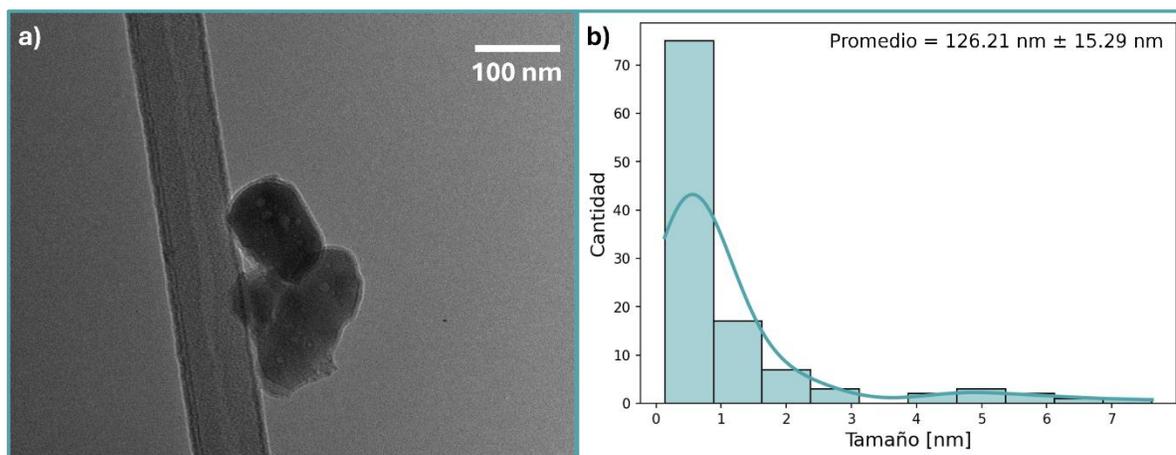


Figura 18. Imagen TEM e histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas (HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650). Nanopartículas de HAp:Eu³⁺ sintetizados por el método de combustión utilizando como combustible el CTAB y tratamiento térmico final de 650°C. a) micrografía TEM, b) histograma de distribución de tamaños con promedio.

La Figura 18 revela que para las nanopartículas sintetizadas por el método de combustión obtuvieron tamaños promedio de $126.21 \text{ nm} \pm 15.29 \text{ nm}$, con una morfología cuasi esférica. Para este nanomaterial, se obtuvieron imágenes donde se aprecian aglomerados de nanopartículas.

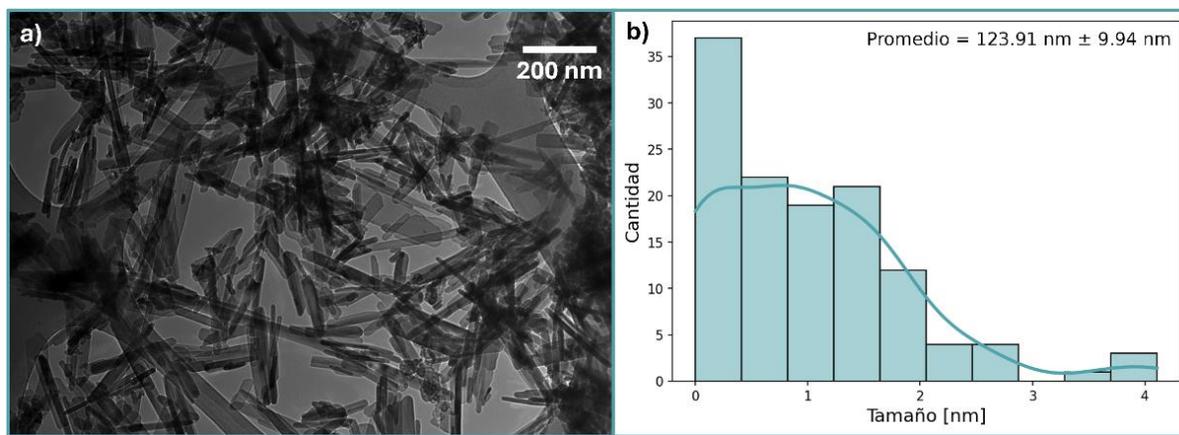


Figura 19. Imagen TEM e histograma de distribución de tamaño de las nanorods (HAp:Eu³⁺-HT). Nanorods de HAp:Eu³⁺ sintetizados por el método hidrotérmal. a) micrografía TEM, b) histograma de distribución de tamaños con promedio.

La Figura 19 revela que el material sintetizado por el método hidrotérmal obtuvo tamaños promedio de $123.91 \text{ nm} \pm 9.94 \text{ nm}$ de largo y espesores de entre 10-50 nm. La morfología presentada es de nanorods (nanobarillas), se observa la dispersión exitosa del nanomaterial en toda la superficie de la rejilla de cobre y sin presencia de aglomeraciones.

Para las demás síntesis de HAp:Eu³⁺, se presentan las imágenes TEM e histogramas de distribución de tamaños en el Anexo A.

3.2.3 BET

El análisis BET de las nanopartículas (HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650) y nanorods (HAp:Eu³⁺-HT) fue realizado con el fin de obtener el valor del área superficial total. Los resultados muestran que el área superficial correspondiente a las HAp:Eu³⁺-CB-TAB650 ($3.5476 \text{ m}^2/\text{g}$), así como la de las HAp:Eu³⁺-HT ($11.1346 \text{ m}^2/\text{g}$) presentan un valor bajo. Un valor bajo para el área superficial de las HAp:Eu³⁺ indica que el material tiene porosidad muy escasa.

3.2.4 Difracción de Rayos-X

El difractograma de rayos-X nos permite identificar si la muestra es cristalina o no e identificar cuantas y cuales fases cristalinas están presentes, la pureza de la fase y sus propiedades estructurales. En ambos nanomateriales se obtuvieron picos afilados sugiriendo una buena cristalinidad.

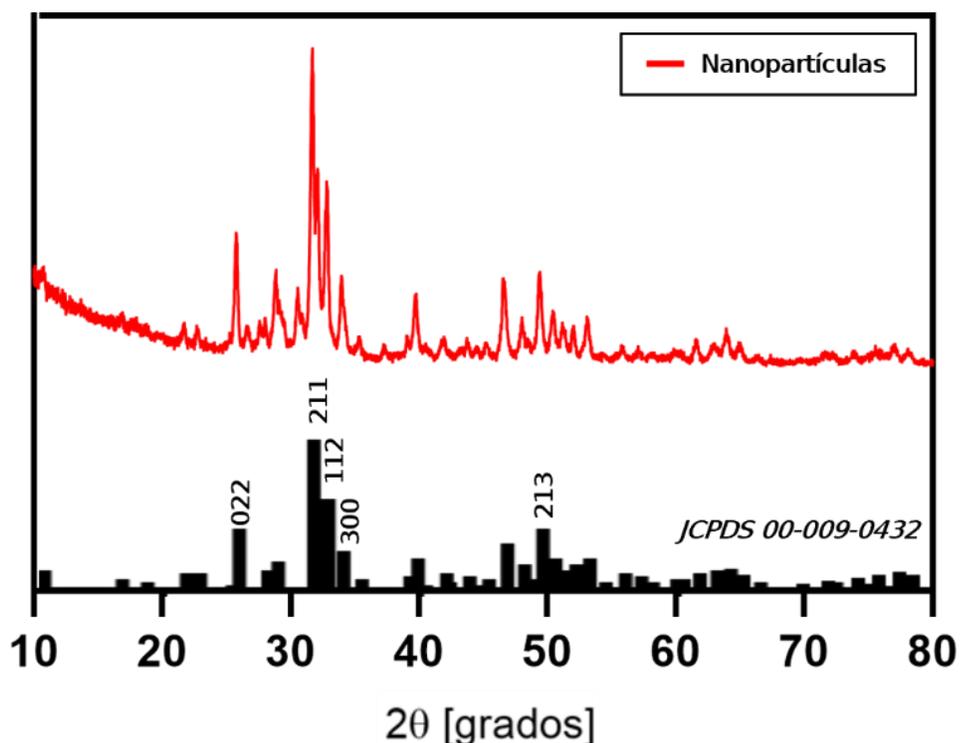


Figura 20. XRD de nanopartículas. En la parte inferior de la gráfica se presentan los picos asociados a la estructura cristalina de hidroxiapatita con los planos cristalinos más importantes. En la parte superior, se muestra el difractograma de rayos-X para las nanopartículas sintetizadas por el método de combustión.

En la Figura 20, correspondiente al difractograma de rayos-X de las nanopartículas, se identificaron los picos correspondientes a la estructura cristalina de la hidroxiapatita a partir de la base de datos JCPDS #00-009-0432. Para esta muestra no se observan picos adicionales, sin embargo se tiene un corrimiento de 2θ hacia la derecha, lo que sugiere una contracción de la red cristalina asociada con el dopaje de iones de Eu^{3+} .

En la Figura 21, correspondiente al difractograma de rayos-X de los nanorods, de manera semejante al difractograma anterior se tienen coincidencias para los picos correspondientes a la estructura cristalina de la hidroxiapatita a partir de la base de datos JCPDS #00-009-0432, sin embargo la muestra presenta picos adicionales asociados a la obtención de una fase secundaria. Para identificar esta fase, se realizó la

búsqueda de otros difractogramas asociados a la síntesis de este tipo de materiales, obteniéndose coincidencia para los picos marcados por un asterisco con la JCPDS 20-1044 correspondiente a la fase hexagonal del EuPO_4 .

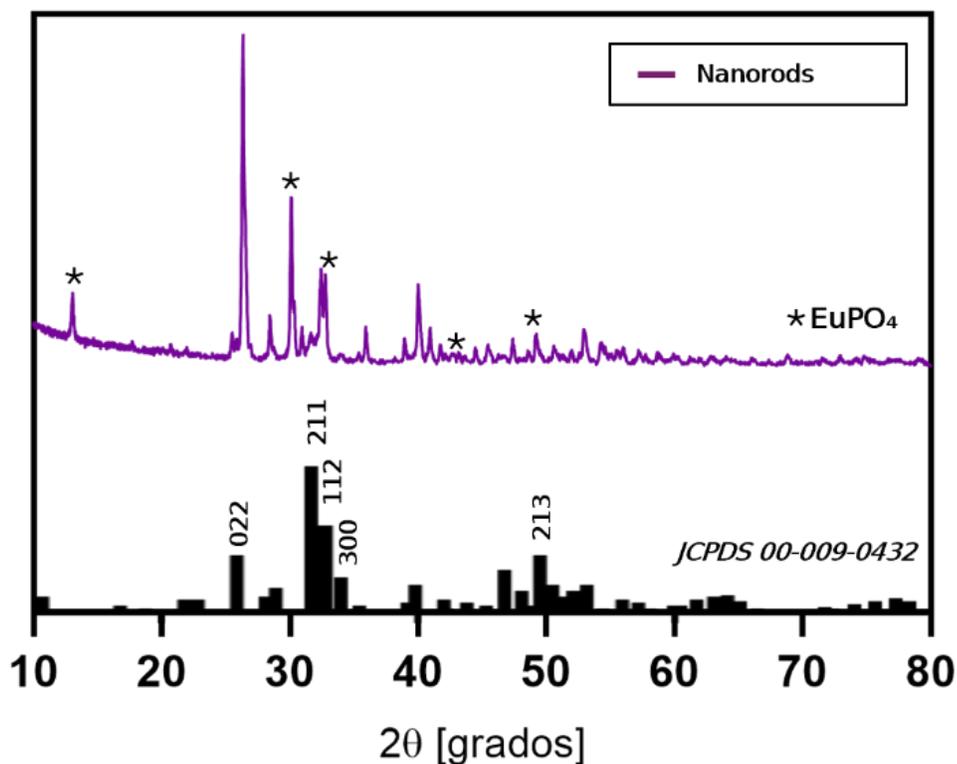


Figura 21. XRD de nanorods. En la parte inferior de la gráfica se presentan los picos asociados a la estructura cristalina de hidroxiapatita con los planos cristalinos más importantes. En la parte superior, se muestra el difractograma de rayos-X para los nanorods sintetizadas por el método hidrotérmal. Con un * se muestran los picos asociados a la fase del EuPO_4 , fase secundaria presente en el nanomaterial.

A partir de los difractogramas obtenidos y aplicando la Ecuación 3, se obtuvo el tamaño promedio del cristal para todas las HAp:Eu^{3+} sintetizadas, mostrados en la Tabla 3. Se obtuvo un promedio del tamaño del cristalito para todas las síntesis de HAp:Eu^{3+} de 4.87 nm.

Para el caso de las sintetizadas por el método de combustión se tiene un promedio de 3.08 nm, mientras que las del método hidrotérmal 5.95 nm. Para las síntesis que llevan un tratamiento térmico final, se tiene un promedio de tamaño de cristal de 3.93 nm, a diferencia de los nanorods que no se le dio tratamiento térmico final con un promedio de 11.51 nm.

Para las demás síntesis de HAp:Eu^{3+} , se presentan los difractogramas de rayos-X obtenidos en el Anexo B.

Tabla 3. Tamaño promedio del cristal de las HAp:Eu³⁺. Mediciones calculadas a partir del difractograma de rayos-X para cada una de las HAp:Eu³⁺ sintetizadas, obtenidas mediante la ecuación de Scherrer.

HAp:Eu³⁺	Picos medidos	Tamaño promedio del cristal (nm)
HAp:Eu ³⁺ -CB-CH1100	24	1.641
HAp:Eu ³⁺ -HT-CTAB650	14	4.448
HAp:Eu ³⁺ -CB-CTAB650	22	3.568
HAp:Eu ³⁺ -CB-CH650	14	3.145
HAp:Eu ³⁺ -HT	9	11.512
HAp:Eu ³⁺ -HT-200	9	3.551
HAp:Eu ³⁺ -HT-400	18	3.011
HAp:Eu ³⁺ -HT-500	11	8.121
Promedio		4.87

3.2.5 Espectroscopía de Dispersión de Energía

La espectroscopía de dispersión de energía (EDS) se realizó con el fin de identificar los elementos químicos presentes en los nanomateriales.

En la Figura 22, se identificó la presencia de oxígeno alrededor de 0.5 keV, carbono alrededor de 0.2 keV, fósforo alrededor de los 2 keV y calcio en sus formas Alpha y beta en 3.7 y 4 keV respectivamente. La presencia de los elementos Ca, P y O, sugiere que la muestra está compuesta por un fosfato de calcio, posiblemente hidroxiapatita.

Por otra parte, en el inciso a) referente a las nanopartículas, se tiene la presencia de carbono, un pico de muy poca intensidad cerca de 0.3 keV, el cual está relacionado con un contaminante ambiental y es de carácter despreciable.

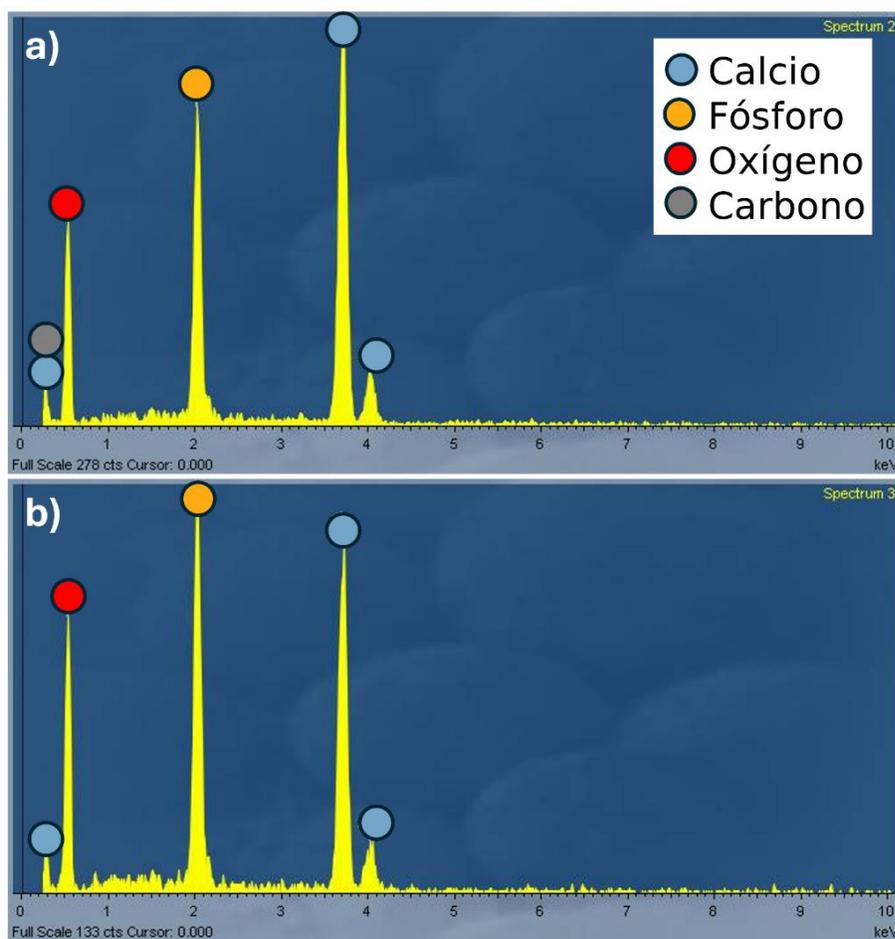


Figura 22. Gráficas de EDS para HAp:Eu³⁺: a) Nanopartículas (HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650), b) Nanorods (HAp:Eu³⁺-HT).

3.2.6 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

Mediante la Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier se complementó el análisis químicos de las muestras.

En la Figura 23, en los espectros para ambos nanomateriales se observa a presencia de bandas alrededor de 1090 cm^{-1} asociadas al estado vibracional ν_3 del $[\text{PO}_4]^{3-}$, mientras que la banda asociada al estado vibracional ν_1 se presenta alrededor de los 962 cm^{-1} , así mismo la banda alrededor de los 564 cm^{-1} se asocia al ν_4 del $[\text{PO}_4]^{3-}$. La presencia de las bandas anteriores está asociada a la hidroxiapatita cristalizada. Por otra parte, en ambos espectros alrededor de 1410 cm^{-1} se tiene una banda asociada a los enlaces C-O característicos de los grupos carbonato ($\nu_3 [\text{CO}_3]^{2-}$).

Por su parte, los nanorods muestran la presencia de $[\text{HPO}_4]^{2-}$ alrededor de los 875 cm^{-1} sugiriendo la formación de hidroxiapatita de calcio (Iconaru et al., 2013).

Para las demás síntesis de HAp:Eu^{3+} , se presentan los resultados de la Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier en el Anexo C.

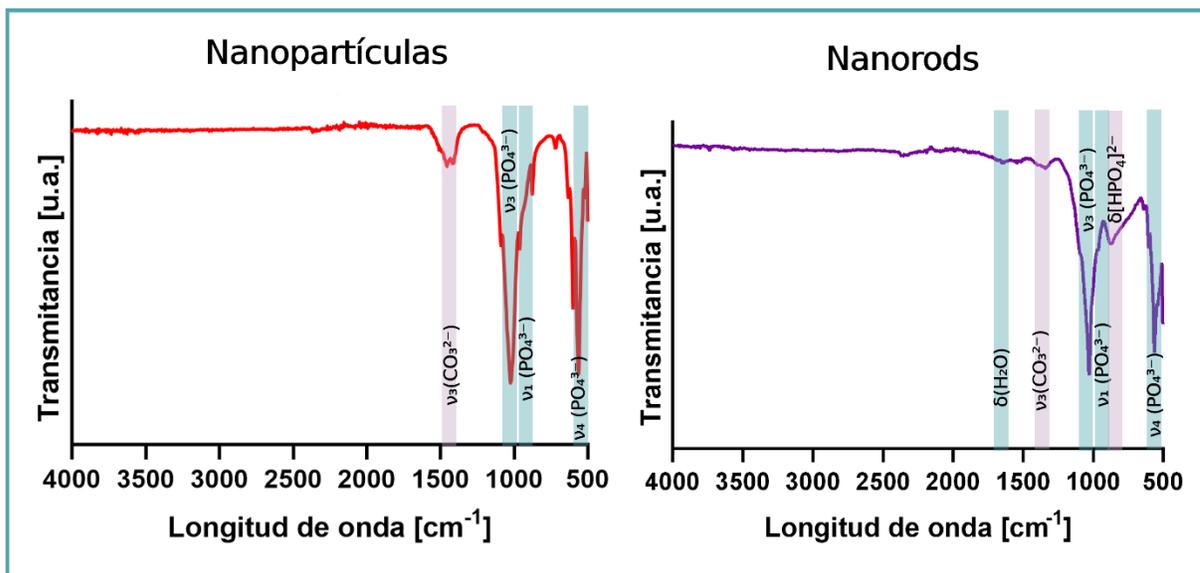


Figura 23. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier de nanopartículas ($\text{HAp:Eu}^{3+}\text{-CB-CTAB650}$) y nanorods ($\text{HAp:Eu}^{3+}\text{-HT}$). En ambos espectros se observa la presencia de fosfato (PO_4^{3-}) característico de la hidroxiapatita, hay diferencias entre los dos espectros que se reflejan en la intensidad y ancho de las bandas asociados a la cristalinidad del material, así como la presencia de agua y carbonato.

3.2.7 Fotoluminiscencia

Con el fin de caracterizar ópticamente los nanomateriales, se realizaron espectros de fotoluminiscencia.

Inicialmente, los materiales fueron excitados con una longitud de onda de 254 nm con el fin de obtener los espectros de excitación. Ambos materiales mostraron que la mejor longitud de onda de excitación es de 394 nm , apreciado del lado izquierdo de la Figura 24. Por otra parte, a la derecha de dicha figura se muestran los espectros de emisión, resultando en un pico máximo alrededor de los 620 nm para ambos materiales correspondiente a la región del rojo, lo cual es característico de los iones de Eu^{3+} presentes. Se muestra un segundo pico intenso en la región del infrarrojo cercano alrededor de los 700 nm . Los espectros muestran que se tiene una mayor intensidad para las nanopartículas con respecto a los nanorods.

Para las demás síntesis de HAp:Eu^{3+} , se presentan los espectros de fotoluminiscencia en el Anexo D.

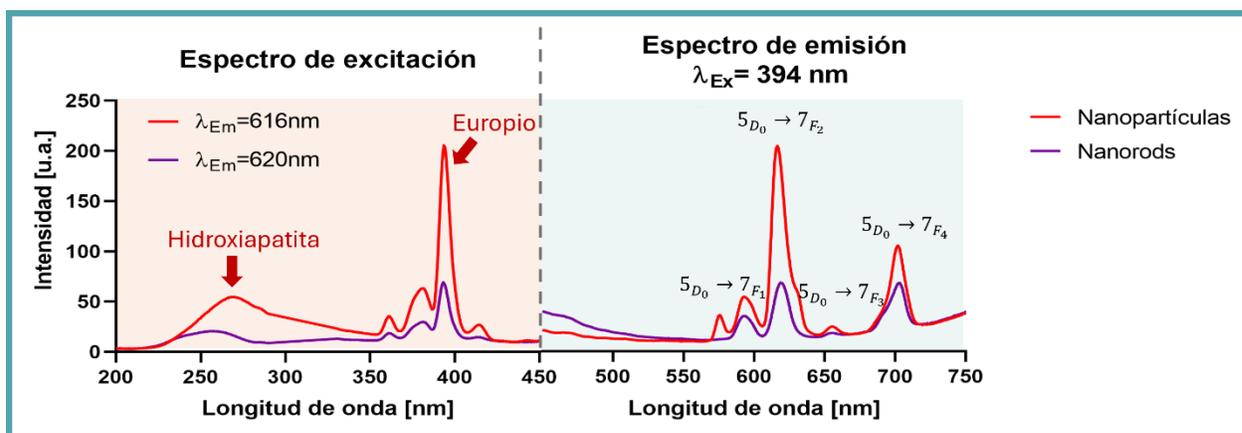


Figura 24. Espectros de fotoluminiscencia para nanopartículas (HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650) y nanorods (HAp:Eu³⁺-HT). Del lado izquierdo, espectro de excitación obtenido para las nanopartículas y nanorods a partir de sus mejores longitudes de onda de excitación respectivo, así como los picos asociados a la red hospedera (HAp) alrededor de los 260 nm y al Europio (Eu³⁺) en 394 nm, siendo el último la mejor longitud de onda de excitación para ambos materiales. Del lado derecho, espectro de emisión obtenido para las nanopartículas y nanorods al excitar ambos materiales con una longitud de onda de 394 nm, se presentan las transiciones electrónicas asociadas a los picos del espectro.

3.2.8 Catodoluminiscencia

Para complementar la caracterización óptica de los nanomateriales, se obtuvieron espectros de catodoluminiscencia. En la Figura 25 se obtuvo un pico máximo de emisión alrededor de los 620 nm para ambas muestras, resultando una mayor intensidad correspondiente a los nanorods. Se muestra un segundo pico alrededor de los 700 nm, correspondiente al infrarrojo cercano.

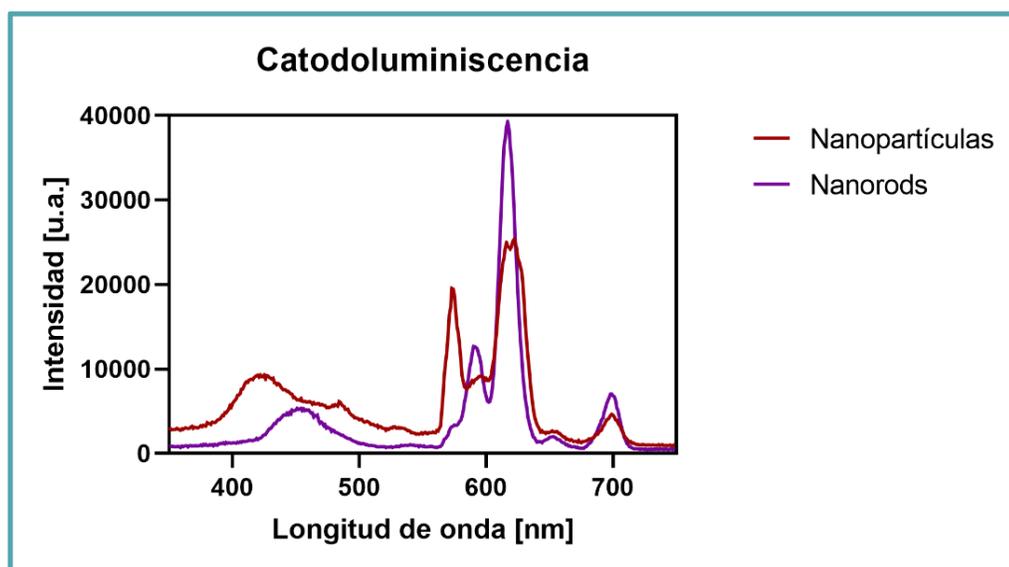


Figura 25. Espectro de catodoluminiscencia de nanopartículas (HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650) y nanorods (HAp:Eu³⁺-HT). El espectro de catodoluminiscencia en color rojo corresponde a las nanopartículas, mientras que el espectro en color morado corresponde a los nanorods.

3.3 Ensayos *in vitro*

3.3.1 Ensayo de viabilidad celular

Para evaluar la biotoxicidad de los nanomateriales se empleó el ensayo colorimétrico de viabilidad celular mediante el compuesto MTT, utilizando células de pre-osteoblastos y células epiteliales. Los resultados obtenidos se analizaron conforme a la ISO 10993-5, referente a la evaluación biológica de dispositivos médicos para la prueba de citotoxicidad *in vitro*.

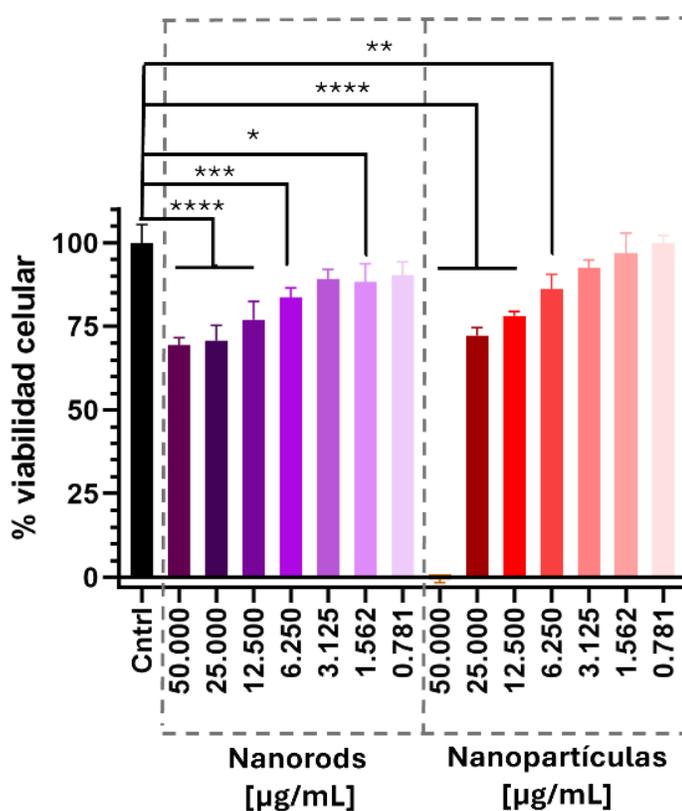


Figura 26. Ensayo de viabilidad celular de la línea celular de pre-osteoblastos de ratón MC3T3-E1 tratada por 24 horas con distintas concentraciones de nanopartículas y nanorods. Se presentan en color negro el grupo control, en tonos morados los grupos tratados con nanorods (HAp:Eu³⁺-HT) a distintas concentraciones y en tonos rojizos los grupos tratados con nanopartículas (HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650) a distintas concentraciones. La estadística se hizo mediante análisis ANOVA de una vía. Las diferencias significativas se indican con asteriscos: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

El ensayo utilizando la línea MC3T3-E1 de preosteoblastos corresponde a la Figura 26, donde se observan los grupos de células tratadas con diferentes concentraciones de nanopartículas, en tonos rojos, y

nanorods, en tonos morados, por 24 horas y el grupo control. Para los grupos tratados con nanorods se observa un comportamiento dosis-dependiente, donde los grupos tratados con las concentraciones de 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ muestran una disminución de viabilidad celular por debajo del 80% indicando citotoxicidad ligera, mientras que los demás grupos no presentan un efecto tóxico. Para los grupos tratados con nanopartículas se observa que el grupo tratado con la mayor concentración, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presenta una disminución de la viabilidad celular por debajo del 40% por lo que es considerada como citotoxicidad severa, mientras que para los demás grupos tratados se muestra un comportamiento dosis-dependiente donde los grupos tratados con las concentraciones de 25 y 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentan una disminución en su viabilidad celular menor al 80% por lo que se considera citotoxicidad ligera.

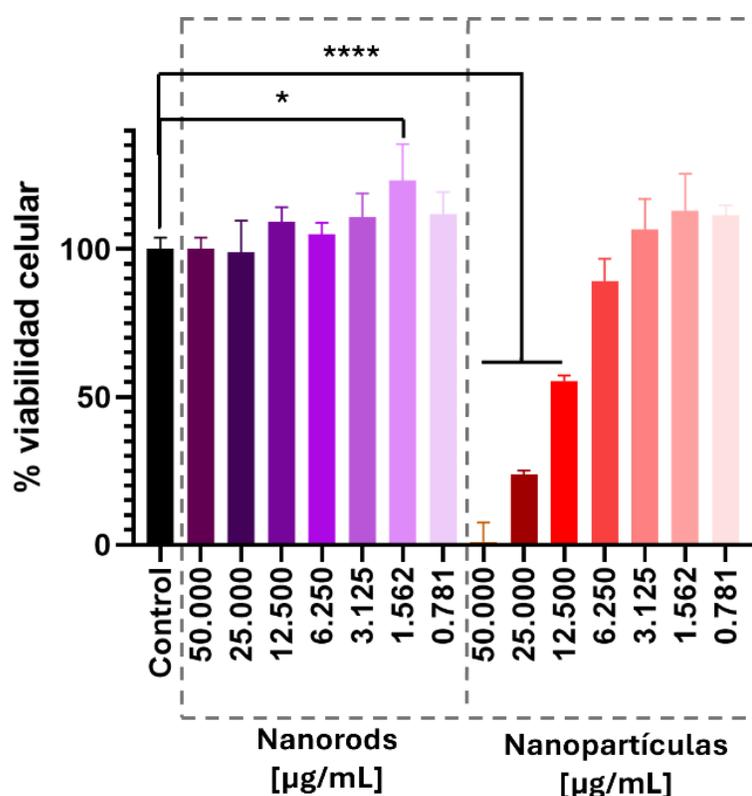


Figura 27. Ensayo de viabilidad celular de la línea de células epiteliales humanas 293T tratadas por 24 horas con distintas concentraciones de nanopartículas y nanorods. Se presentan en color negro el grupo control, en tonos morados los grupos tratados con nanorods (HAp:Eu³⁺-HT) a distintas concentraciones y en tonos rojizos los grupos tratados con nanopartículas (HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650) a distintas concentraciones. La estadística se hizo mediante análisis ANOVA de una vía. Las diferencias significativas se indican con asteriscos: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

Se realizó el ensayo para la línea 293T de células epiteliales, resultados apreciados en la Figura 27. Para los grupos tratados con nanorods, no se muestran cambios significativos (valor de significancia $p < 0.05$) en la viabilidad celular excepto por el grupo tratado con 1.562 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sin embargo este aparente aumento en la

viabilidad es despreciable en biología celular. Para los grupos tratados con nanopartículas se observa una disminución de viabilidad celular correspondiente a las concentraciones de 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por debajo del 40% indicando toxicidad severa, mientras que el grupo tratado con 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presenta una viabilidad celular por debajo del 60% indicando toxicidad moderada, los demás grupos no presentan diferencias significativas respecto al grupo control.

3.3.2 Ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno

3.3.2.1 Ensayo con reactivo DPBF sin presencia de células

Con el fin de analizar la potencial generación de ROS, se realizaron ensayos sin presencia de células utilizando el reactivo DPBF, compuesto que presenta disminución en su absorbancia debido a la presencia de oxígeno al ser excitado con una longitud de onda de 410 nm.

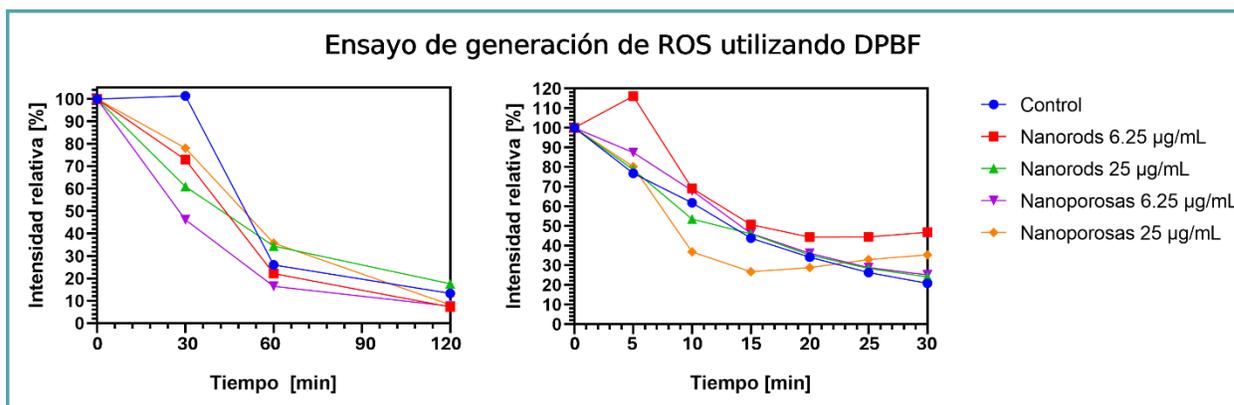


Figura 28. Intensidad relativa de los espectros de emisión para las diluciones con distintas concentraciones de nanopartículas (HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650) y nanorods (HAp:Eu³⁺-HT), así como dilución control del ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno sin presencia de células utilizando el reactivo DPBF. Se realizaron mediciones en dos esquemas experimentales: a la izquierda, las mediciones realizadas a los 0, 30, 60 y 120 minutos; a la derecha, las mediciones fueron realizadas cada 5 minutos durante un periodo de 30 minutos.

En la Figura 28, se muestran los resultados para dos esquemas experimentales. Del lado izquierdo se presenta el esquema experimental donde se tomaron los espectros de emisión para cada dilución cada 30 minutos por un periodo de 2 horas, del lado derecho se muestra el esquema experimental donde se tomaron dichas mediciones cada 5 minutos por un periodo de 30 minutos.

Se tomó la intensidad relativa para cada espectro de emisión obtenido con el fin de relacionar intensidad relativa versus la concentración de los nanomateriales, la gráfica se presenta en la Figura 29. Tras realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas (valor de significancia $p < 0.05$) para las diluciones con distintas concentraciones de nanopartículas y nanorods respecto a la dilución control.

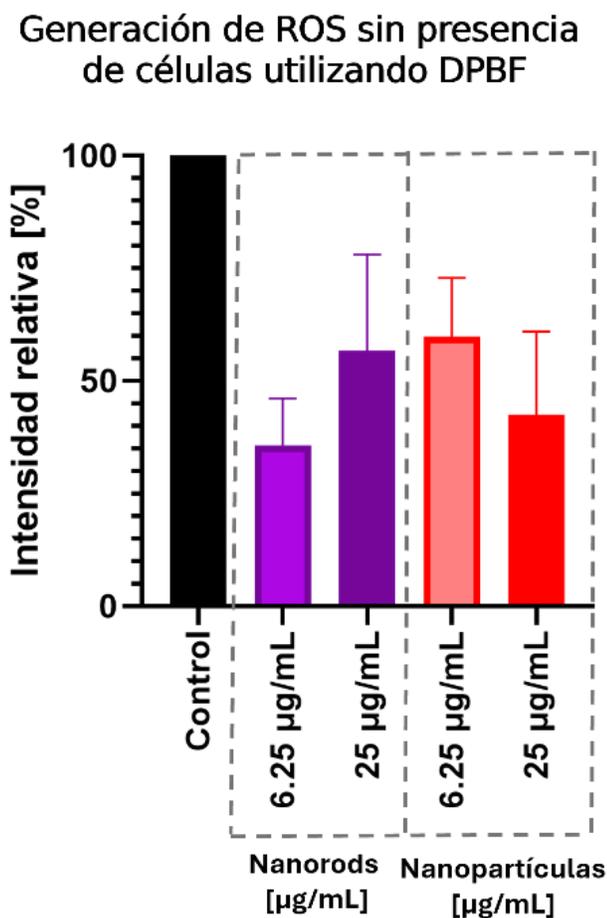


Figura 29. Gráfica de intensidad relativa versus concentración de nanomaterial del ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno sin presencia de células utilizando DPBF. Se presenta grupo control y grupos tratados con 6.25 µg/mL y 25 µg/mL de nanopartículas (HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650) y nanorods (HAp:Eu³⁺-HT), en tonos morados y rojos respectivamente. La estadística se hizo mediante análisis ANOVA de una vía sin encontrar diferencias significativas entre los grupos tratados respecto al control.

3.3.2.2 Ensayo con reactivo CellROX Deep Red en presencia de células

Para estudiar la potencial generación de ROS en presencia de células, se realizaron ensayos con la línea celular HFF-1 de fibroblastos humanos utilizando el colorante CellROX Deep Red, el cual en estado oxidado presenta fluorescencia.

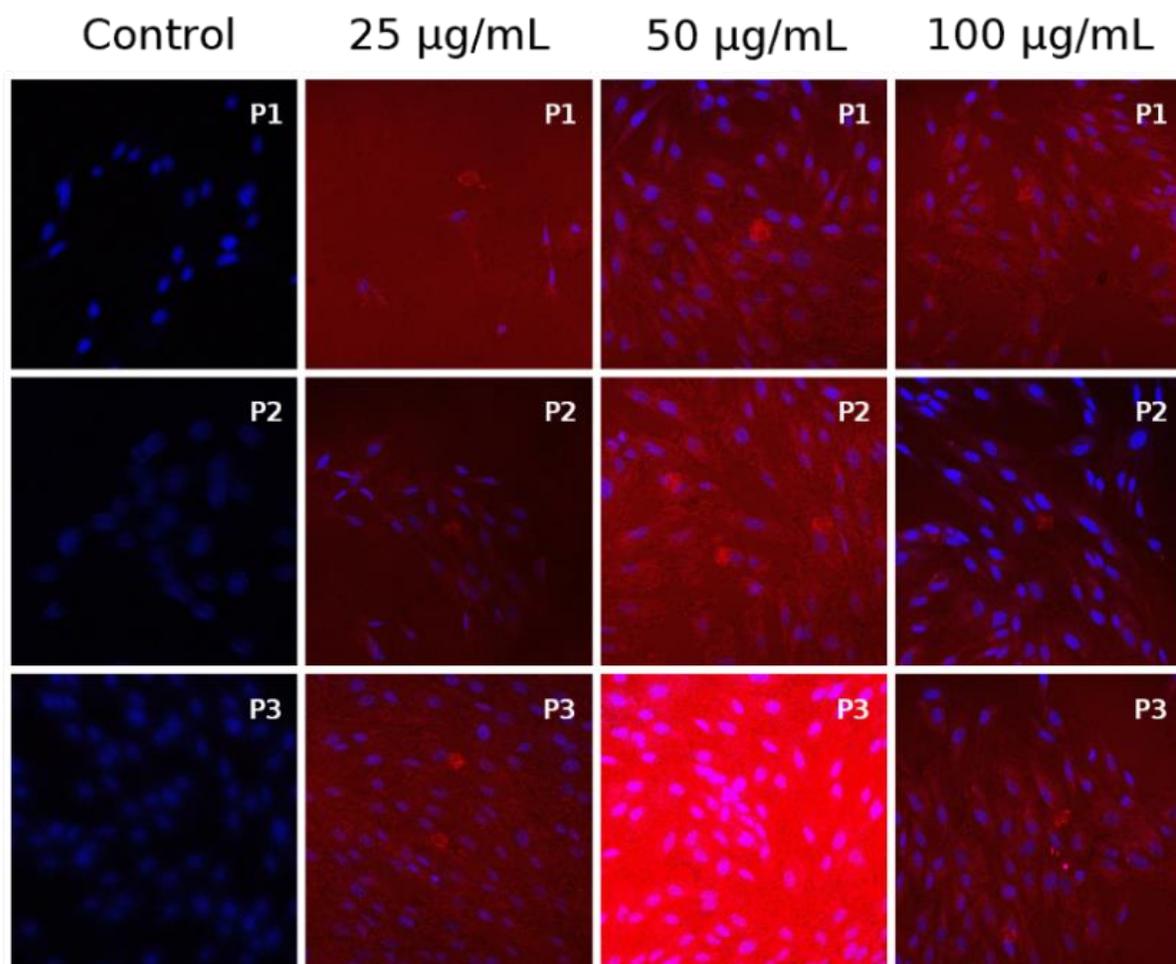


Figura 30. Imágenes de microscopio confocal de fluorescencia del ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno empleando la línea celular HFF-1 de fibroblastos humanos tratadas por 24 horas con distintas concentraciones de nanorods. Células HFF-1 tratadas con nanorods (HAp:Eu³⁺-HT) a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con sus controles. Se presentan imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia uniendo los canales de DAPI y CellROX Deep Red.

Con el fin de analizar de manera cuantitativa las imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia de la Figura 30, se graficó la intensidad promedio por pocillo del canal configurado para el reactivo CellROX Deep Red versus la concentración de nanorods para las tres réplicas del experimento, siguiendo el análisis propuesto por Mandavilli (Mandavilli et al., 2011). Este análisis no tomó en cuenta la réplica de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del pocillo 3 debido al posible error humano durante el experimento.

Generación de ROS en células HFF-1 utilizando CellROX Deep Red

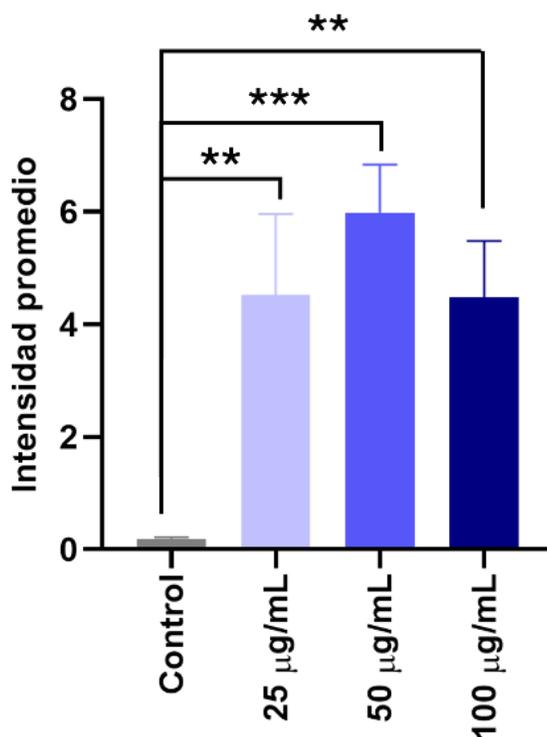


Figura 31. Gráfica de intensidad promedio versus concentración de nanomaterial del ensayo de generación de especies reactivas de oxígeno empleando la línea celular HFF-1 de fibroblastos humanos tratadas por 24 horas con distintas concentraciones de nanorods. Células HFF-1 tratadas con nanorods (HAp:Eu³⁺-HT) a 25 µg/mL, 50 µg/mL y 100 µg/mL con sus controles. Se presenta la intensidad promedio por pocillo versus concentración de nanorods y grupos control. La estadística se hizo mediante análisis ANOVA de una vía. Las diferencias significativas se indican con asteriscos: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

En la gráfica de la Figura 31, tras el análisis estadístico se obtuvieron diferencias significativas (valor de significancia $p < 0.05$) entre los grupos tratados con distintas concentraciones de nanorods respecto al grupo control, obteniéndose que la concentración asociada con mayor generación de ROS es la de 50 µg/mL.

3.4 Ensayos *in vivo*

3.4.1 Condiciones del sistema, reproducción y crecimiento del pez cebra

Se monitorearon periódicamente los parámetros de calidad del agua presentados en la Figura 32 para el mantenimiento del acuario, biofiltro y salud de la población del pez cebra.

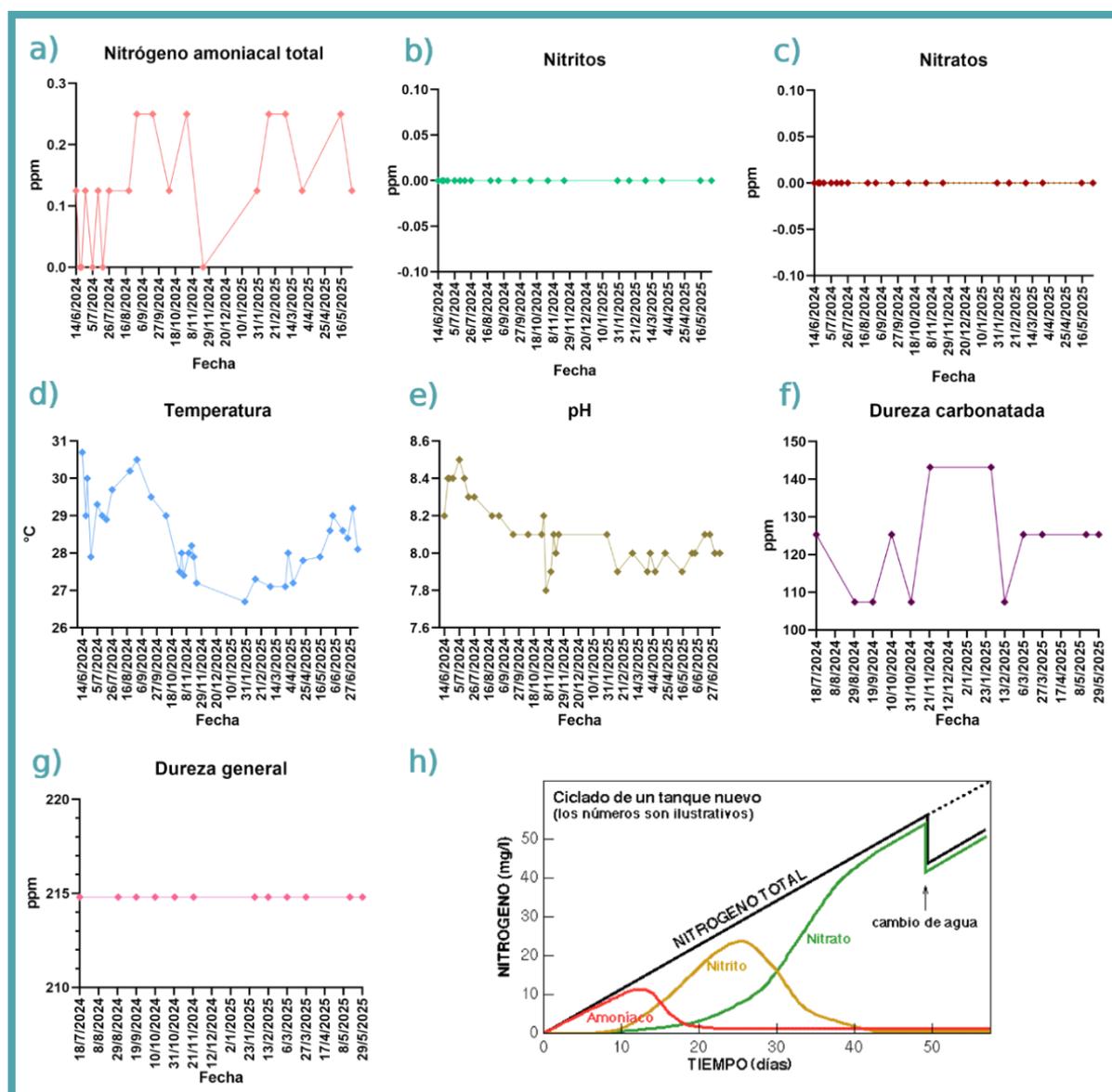


Figura 32. Histórico de las mediciones de calidad del agua del acuario y ciclo del nitrógeno. Gráficas del histórico de la medición de los parámetros de la calidad del agua: a) nitrógeno amoniacal, b) nitritos, c) nitratos, d) temperatura, e) pH, f) dureza carbonatada, g) dureza general. Se presenta la gráfica del ciclo del nitrógeno y su relación con los recambios de agua del sistema del pez cebra (h).

Los parámetros medidos se encuentran dentro de los rangos esperados reportados en la literatura, a excepción de la dureza general del agua, sin embargo se tiene un ambiente sano y adecuado para la reproducción y crecimiento del pez cebra, el resumen de estos datos se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis del histórico de los parámetros de la calidad del agua.

Parámetro	Rango Esperado	Promedio Obtenido	Cumple/No cumple
Nitrógeno amoniacal total	0 ppm	0.13	<input checked="" type="checkbox"/>
Nitritos	0 ppm	0.00	<input checked="" type="checkbox"/>
Nitratos	0 ppm	0.00	<input checked="" type="checkbox"/>
Temperatura	25-29 °C	28.50	<input checked="" type="checkbox"/>
pH	máx. 8.5	8.13	<input checked="" type="checkbox"/>
Dureza carbonatada	70-140 ppm	122.32	<input checked="" type="checkbox"/>
Dureza general	90-210 ppm	214.80	<input type="checkbox"/>

3.4.2 Ensayo de toxicidad en embriones y larvas

3.4.2.1 Exposición oral

En estos ensayos, embriones de pez cebra Fli y WT fueron expuestos durante sus primeras horas post-fertilización (hpf) a distintas concentraciones de nanopartículas y nanorods respectivamente, mediante exposición oral en el medio, con el objetivo de evaluar los efectos de las HAp:Eu³⁺ sobre la viabilidad.

En la Figura 33 se muestra la gráfica de supervivencia versus días post-fertilización para las 3 réplicas de este ensayo realizadas bajo las mismas condiciones experimentales.

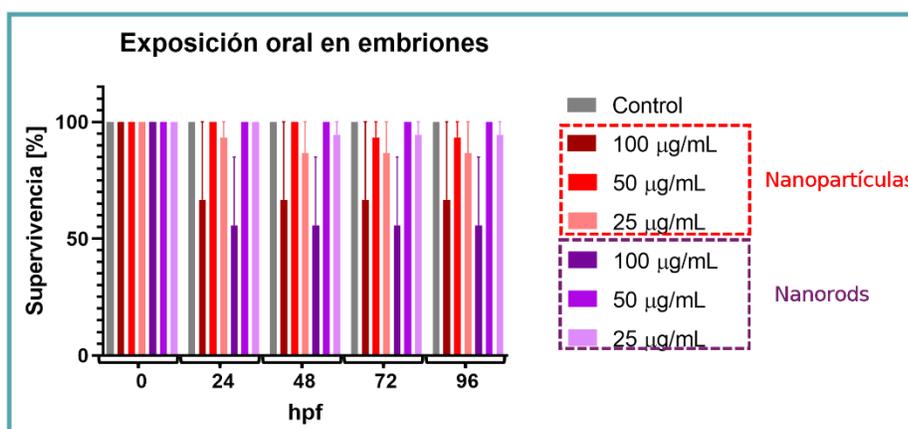


Figura 33. Supervivencia de embriones descoronados tratados con nanopartículas y nanorods por exposición oral. Réplicas del experimento por exposición oral en embriones de pez cebra.

Se realizó la prueba Scheirer-Ray-Hare para el análisis de los efectos del tiempo-concentración-HAp:Eu³⁺ en la tasa de supervivencia de los embriones tratados, se encontró que la concentración era el único factor que presentaba diferencias significativas (valor de significancia $p < 0.05$), lo que indica que los efectos son atribuibles únicamente a este factor sin importar el tiempo de tratamiento ni el tipo de HAp:Eu³⁺ utilizada. Los valores de p para esta prueba se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Efectos del tiempo-concentración-HAp:Eu³⁺ en la tasa de supervivencia de los embriones tratados por la técnica de exposición oral. Valores de p obtenidos para las interacciones tiempo-concentración-HAp:Eu³⁺ mediante la prueba Scheirer-Ray-Hare para el análisis de los efectos en la tasa de supervivencia de los embriones tratados. Se consideró un valor de significancia $p < 0.05$. Las diferencias significativas encontradas están marcadas con un asterisco (*).

Interacción	Factor	Valor de p
Concentración-Tiempo	Concentración (C)	0.00081*
	Tiempo (T)	0.13186
	C:T	0.95775
HAp:Eu ³⁺ -Tiempo	HAp:Eu ³⁺ (HE)	0.11706
	Tiempo (T)	0.13186
	HE:T	0.99473
HAp:Eu ³⁺ -Concentración	HAp:Eu ³⁺ (HE)	0.87982
	Concentración (C)	0.00197*
	HE:C	0.13566

Con esta información, se realizó un Kruskal-Wallis y prueba *post hoc* Dunn para analizar el efecto de la concentración del tratamiento con respecto a la tasa de supervivencia de los embriones de todas las réplicas en conjunto, esto debido a que las réplicas fueron realizadas bajo las mismas condiciones experimentales. Los resultados de la Figura 34 indican que no se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo control y el tratado con la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, así como con el grupo tratado con la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; el grupo tratado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no obtuvo diferencias significativas con el grupo tratado con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pero sí con los grupo control y grupo tratado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

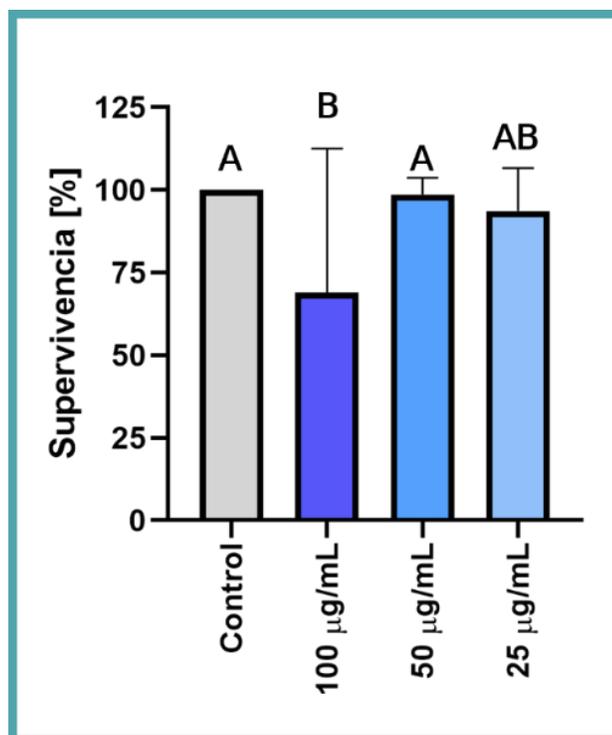


Figura 34. Efecto de la concentración en el porcentaje de supervivencia de los embriones de pez cebra tratados con HAp:Eu³⁺. Gráfica del efecto de la concentración de las HAp:Eu³⁺ en la supervivencia de los embriones de todas las réplicas de los experimentos por exposición oral.

Del mismo modo, con Kruskal-Wallis y la prueba *post hoc* Dunn, se analizaron las réplicas por separado considerando el tipo de cepa utilizado y tipo de HAp:Eu³⁺ para observar la relación entre la concentración de los tratamientos y la supervivencia de los embriones. Los resultados se muestran en Figura 35, donde las diferencias significativas se dan entre los grupos con letras distintas entre ellos.

Aunado a esto, en todas las réplicas se observó la tendencia de los nanomateriales a aglomerarse y precipitar al fondo de los pocillos tratados. Se realizó la medición del tamaño de las partículas precipitadas

obteniendo un tamaño promedio de 404.375 nm. El histograma de tamaños medidos se encuentra en el Anexo E.

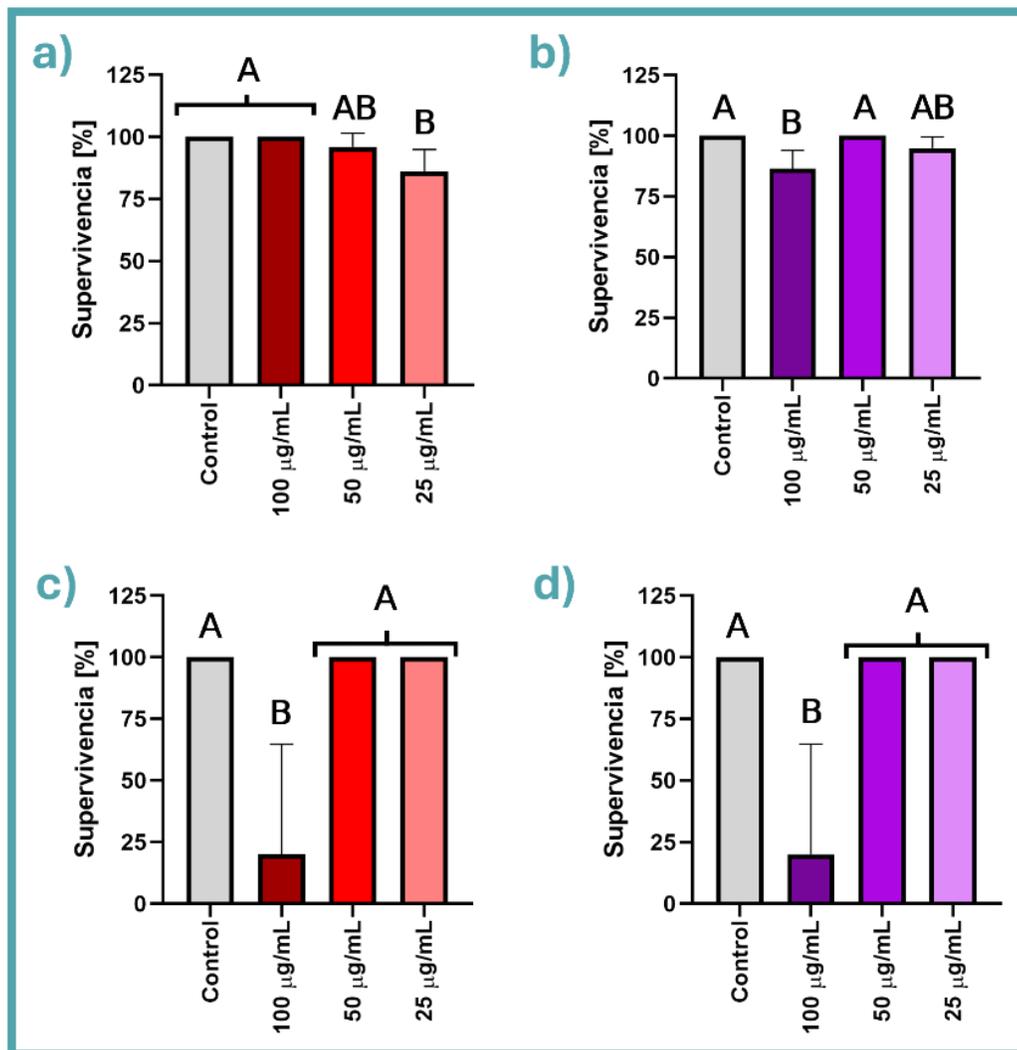


Figura 35. Análisis por cepa y HAp:Eu³⁺ del efecto de la concentración en el porcentaje de supervivencia de los embriones de pez cebra. Kruskal-Wallis y prueba *post hoc* Dunn para analizar las réplicas del experimento por exposición oral: a) embriones de la cepa WT tratados con distintas concentraciones de HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650, b) embriones de la cepa WT tratados con distintas concentraciones de HAp:Eu³⁺-HT, c) embriones de la cepa Fli tratados con distintas concentraciones de HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650, d) embriones de la cepa Fli tratados con distintas concentraciones de HAp:Eu³⁺-HT.

Por otra parte, las réplicas de los experimentos de exposición oral de las larvas tratadas con distintas concentraciones de nanopartículas y nanorods no mostraron diferencias en la supervivencia con respecto a los controles, es decir, tanto los grupos tratados como los controles mantuvieron el mismo número de organismos desde el inicio hasta la conclusión del experimento, lo que indica que bajo las condiciones

evaluadas no se observó un efecto tóxico atribuible a las HAp:Eu³⁺. Las imágenes asociadas a una de las réplicas de estos experimentos pueden ser consultadas en el Anexo F.

3.4.2.2 Microinyección

En estos ensayos se microinyectaron distintas concentraciones de nanorods y nanopartículas en embriones de pez cebra Fli durante las primeras 3 hpf y a las 22 hpf. La supervivencia de los embriones no se vio afectada por lo que se muestran observaciones cualitativas realizadas durante el experimento en la Figura 36, donde en a) se puede observar la formación de burbujas entre el corión y el pez, en b) la formación de un edema en la zona del pericardio, en c) una larva recién eclosionada que presenta ausencia de vasculatura en una porción del torso, y d) un embrión con escoliosis y ausencia del desprendimiento cola-vitelo.

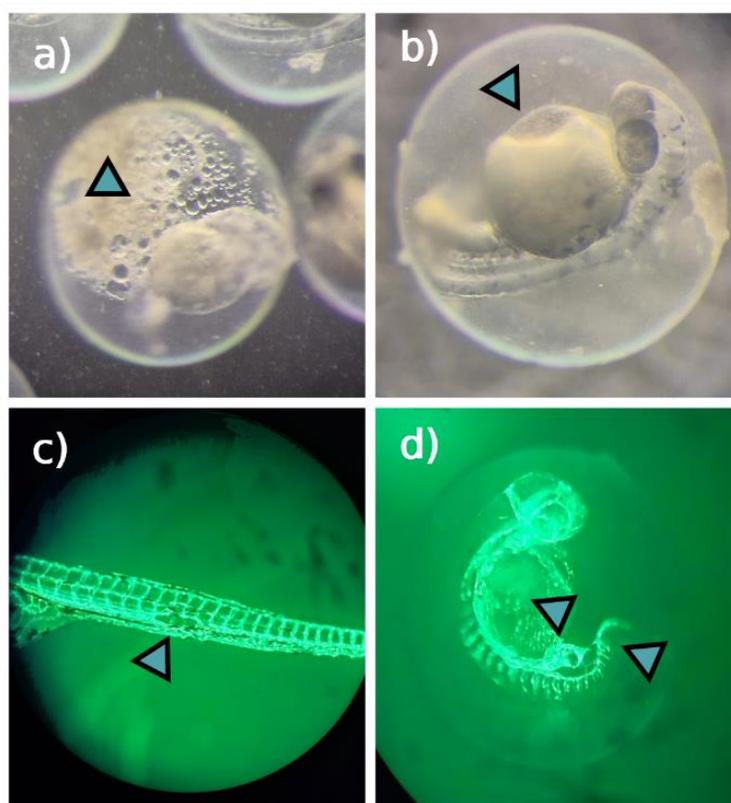


Figura 36. Observaciones del experimento de microinyección en embriones Fli. a) Embrión microinyectado a las 3 hpf presenta burbujas entre el espacio corion-pez, b) Embrión microinyectado a las 3 hpf presenta cúmulo de sangre en el pericardio, c) Larva recién eclosionada microinyectada a las 3 hpf presenta ausencia de vasculatura en una porción del torso, d) Embrión microinyectado a las 3 hpf presenta ausencia del desprendimiento de la cola-vitelo con una porción extra de tejido vascularizado y escoliosis.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Síntesis de nanopartículas luminiscentes

De acuerdo con la literatura, en la síntesis de HAp:Eu³⁺, los iones de Eu³⁺ sustituyen a los iones de Ca²⁺ en la red anfitriona. Lo anterior se debe a la similitud estructural de ambos iones, el radio del ion Eu es cercano al del ion Ca y a su vez los iones de Eu tienen un mayor potencial iónico por lo que es más probable que estos ocupen los sitios del ion Ca al momento del dopaje.

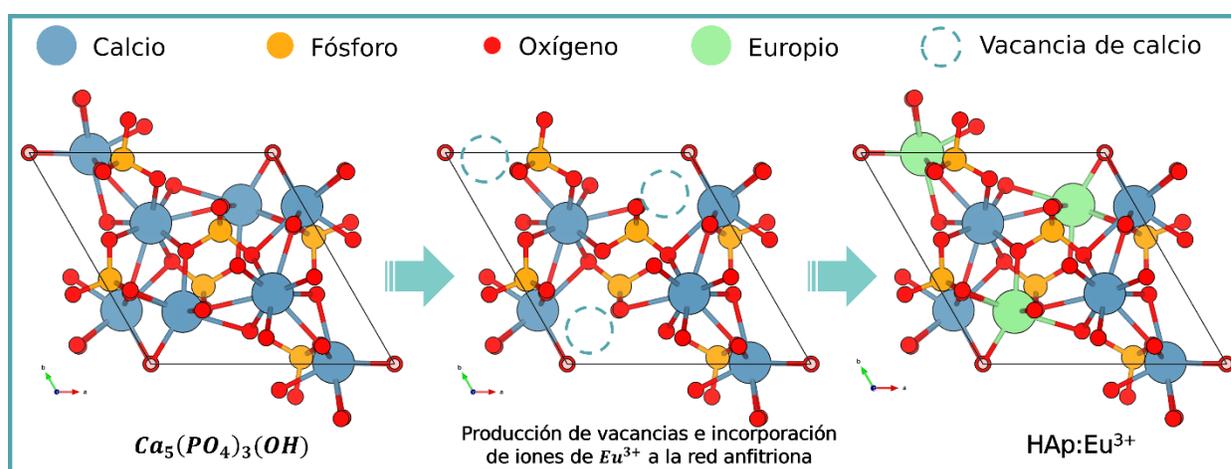


Figura 37. Esquema de una molécula de HAp:Eu³⁺. Representación cualitativa de una molécula de HAp:Eu³⁺ generada debido a la producción de vacancias e incorporación de los iones de Eu³⁺ a la red anfitriona, donde toman el lugar de algunos iones de Ca²⁺.

En general, los métodos de síntesis proporcionan distintas ventajas entre ellos asociados a la rapidez de reacción, luminiscencia, cristalinidad y pureza. Por su parte, el tratamiento térmico promueve la aglomeración de los nanomateriales resultantes como lo reportado por Vega-Zerpa y colaboradores tanto para el método de combustión como el método hidrotérmico (Vega-Zerpa et al., 2025). Las HAp:Eu³⁺ sintetizadas en este trabajo concuerdan con lo reportado en la literatura ya que a mayor temperatura de tratamiento térmico fueron obtenidos materiales con mayor tendencia a aglomerarse como puede observarse en las micrografías TEM del Anexo A, donde también es posible observar la diferencia de tamaños entre nanomateriales sintetizados. Una mayor cristalinidad para los materiales por el método de combustión puede apreciarse en el Anexo B donde la fase pura de hidroxiapatita es observada en la mayoría de las muestras, mientras que las muestras sintetizadas por el método hidrotérmico al emplear menores temperaturas durante la síntesis suelen tener fases secundarias en el difractograma de rayos-X.

Por último, las muestras sintetizadas por el método de combustión presentan en su mayoría una mayor intensidad en los espectros de fotoluminiscencia observados en el Anexo D.

4.2 Caracterizaciones fisicoquímicas

Las micrografías SEM nos proporcionaron información de la superficie de las muestras, obteniéndose partículas superiores a 5 μm en ambos casos debido a la aglomeración natural de los nanomateriales metálicos. Por su parte, las micrografías TEM nos proporcionaron información de morfología de la muestra, obteniendo que las HAp:Eu³⁺ sintetizadas por el método de combustión-CTAB-650°C y las sintetizadas por el método hidrotermal sin tratamiento térmico presentaban morfologías distintas. Las HAp:Eu³⁺-CB-CTAB650, nanopartículas cuasi esféricas, de tamaño promedio de 126.21 nm \pm 15.29 nm, mientras que las HAp:Eu³⁺-HT, nanorods, de tamaño promedio de 123.91 nm \pm 9.94 nm de largo y espesores de entre 10-50 nm. En estas micrografías también se pudo observar la posible presencia de poros en los nanomateriales asociados a la diferencia de tonalidades en tonos grises, con el fin de comprobarlo se realizaron análisis BET para ambos materiales. Sin embargo, los resultados sugieren ausencia o escasa porosidad pues se obtuvo un área superficial con valores bajos.

Con el análisis XRD se comprobó la presencia de la fase hexagonal de la HAp en ambas muestras, sin embargo se obtuvo una mayor pureza para las nanopartículas, concluyéndose que se obtuvieron nanomateriales de fosfatos de calcio altamente cristalinos. Los fosfatos de calcio se han estudiado ampliamente en regeneración ósea pues tienen las características de osteoinducción, osteoconducción, osteogénesis y angiogénesis (Malhotra & Habibovic, 2016), por lo que los nanomateriales sintetizados resultan potenciales candidatos para esta aplicación.

La espectroscopía EDS proporciona información sobre la composición química de los nanomateriales, permitiendo identificar y cuantificar los elementos químicos presentes en las muestras. Para ambos nanomateriales, nanopartículas y nanorods, se tienen presentes los picos correspondientes a los elementos de: Oxígeno alrededor de los 0.5 keV, Fósforo alrededor de los 2 keV y Calcio alrededor de los 0.2 keV y 4 keV presente en sus formas K α y K β . La presencia de estos elementos confirma y respalda los datos de la composición de los nanomateriales presentando HAp y fosfatos de calcio. A su vez, la espectroscopía FTIR permitió identificar los estados vibracionales de los enlaces químicos del fosfato y carbonato, así como enlaces OH presentes en los nanomateriales, respaldando los resultados obtenidos para el análisis químico.

El análisis de la fotoluminiscencia de las HAp:Eu³⁺ nos muestra que tenemos emisión de las nanopartículas en el espectro visible con una longitud de onda de 620 nm correspondiente al color rojo al ser excitados con luz UV de 394 nm como mejor excitación para ambas muestras. Asimismo, se encontró un segundo pico de emisión ubicado en el infrarrojo, correspondiente a la primer ventana biológica del organismo, beneficiando en aplicaciones de bioimagen (Du et al., 2024). Complementando la caracterización óptica, los resultados de catodoluminiscencia, en donde se emplea una mayor cantidad de energía y mayor penetración en la muestra, nos muestran una mayor intensidad del espectro de emisión para los nanorods con respecto a las nanopartículas.

4.3 Ensayos *in vitro*

4.3.1 Viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad celular mediante MTT mostraron diferencias claras entre las líneas celulares evaluadas y los nanomateriales. En la línea de pre-osteoblastos MC3T3-E1, las nanopartículas exhibieron un efecto tóxico mayor en comparación con los nanorods. En contraste, en la línea 293T no se observaron efectos citotóxicos asociados a los nanorods, mientras que las nanopartículas presentaron una IC₅₀ cercana a la concentración de 12.5 µg/mL. En general, se observó un comportamiento dosis-dependiente, con la excepción de los nanorods en la línea 293T, donde no se evidenció relación entre concentración y viabilidad celular.

Resultados consistentes se han reportado con nanopartículas de hidroxiapatita co-dopadas de Eu³⁺, Eu³⁺/Sr²⁺ con distintas concentraciones de iones trivalentes de europio (Sundarabharathi et al., 2018). Los ensayos reportados por Sundarabharathi y colaboradores en células HEK-293 expuestas a concentraciones entre 20-375 µg/mL, no mostraron diferencias significativas en la viabilidad ni alteraciones morfológicas celulares durante los 5 días de exposición, manteniéndose entre el 95-97% de viabilidad celular. De forma similar, los nanorods funcionalizados con arginina fueron evaluados en células epiteliales pulmonares A549, utilizando concentraciones de 20 a 200 µg/mL con tiempos de exposición de 4-8-24-48 horas, los resultados no mostraron afectaciones en la viabilidad celular (Yan-Zhong et al., 2011). Estos resultados respaldan la biocompatibilidad de los nanomateriales dopados con Eu³⁺, confirmando la ausencia de respuesta citotóxica significativa.

El porcentaje de dopaje también juega un papel importante en la respuesta celular. Pontes y colaboradores (2024) evaluaron nanopartículas dopadas al 1% de HAp:Eu³⁺ y HAp:Eu³⁺+AgNPs (nanopartículas de plata) en células GM07492A tratadas por 24 horas con concentraciones de 9.76 a 1250 µg/mL, mostraron que tanto para las nanopartículas puras como las adicionadas el valor de IC₅₀ era superior a 1250 µg/mL, concluyendo que no presentaba citotoxicidad aparente (Pontes et al., 2024). En contraste, los nanomateriales sintetizados en este trabajo, con un porcentaje de dopaje de 5%, mostraron un incremento en la sensibilidad celular, lo que sugiere que un mayor contenido de iones trivalentes de europio en la red cristalina puede disminuir la viabilidad sin llegar a comprometer la biocompatibilidad.

En general, las nanopartículas presentan una mayor citotoxicidad con respecto a los nanorods. Esta diferencia puede atribuirse a las propiedades mecánicas de los nanorods, las cuales mejoran la interacción con las células, y al mismo tiempo ofrecen una mayor área superficial que beneficia la proliferación celular. Estudios recientes asocian a los nanorods con aplicaciones como andamios en regeneración de hueso y sistemas de liberación de fármacos (Damiri et al., 2024). En este sentido, Liu y colaboradores demostraron que nanorods de mayor tamaño y porcentaje de cristalinidad inducían un aumento en la proliferación de osteoblastos de la línea MG-36, tratados con concentraciones de hasta 200 µg/mL durante 5 días, sin observar efectos tóxicos (X. Liu et al., 2012).

En conjunto, los resultados sugieren que la respuesta citotóxica de los nanomateriales no solo depende de la línea celular evaluada, sino también de la morfología, la concentración, el porcentaje de dopaje y las condiciones de tratamiento de los nanomateriales. En contraste con la literatura, los resultados de este trabajo destacan una mayor sensibilidad de ambas líneas celulares, MC3T3-E1 y 293T, frente a las nanopartículas, lo que resalta la necesidad de considerar de manera integral las características fisicoquímicas de los nanomateriales en la evaluación biológica.

4.3.2 Generación de especies reactivas de oxígeno

El ensayo de generación de ROS en presencia de células HFF-1 tratadas con HAp:Eu³⁺-HT por 24 horas, presentó diferencias significativas entre los grupos tratados respecto al grupo control, obteniéndose una mayor generación de ROS en el grupo tratado con 50 µg/mL, en comparación a los tratados con 100 y 25 µg/mL. Esto puede deberse a que a mayores concentraciones, se tiene un aumento en la aglomeración de los nanorods, provocando que no sean endocitados por las células en su totalidad. También en la Figura 30, en todos los pocillos tratados se observa una mayor fluorescencia asociada a los nanomateriales, ya

que esta tiene la morfología de los nanorods aglomerados. La generación de ROS está asociada a la presencia de las HAp:Eu³⁺, y posiblemente a la presencia en particular de los iones de europio por sí mismos como lo reportado para los nanomateriales sintetizados por Patra y Zhao (Patra et al., 2011; Zhao et al., 2016).

4.4 Ensayos *in vivo*

4.4.1 Ensayos de toxicidad

4.4.1.1 Ensayos en embriones de pez cebra

Los ensayos realizados por exposición oral mostraron efectos relacionados con la concentración de los tratamientos en la supervivencia de los embriones, sin importar el tiempo de tratamiento ni el tipo de HAp:Eu³⁺. El grupo tratado con la máxima concentración resultó en una disminución de la supervivencia de los embriones por debajo del 75% (Figura 34), estos resultados son parecidos a los reportados por Balaji-Ganesh y colaboradores (2025) al probar extractos naturales cargados en andamios de hidroxiapatita por exposición oral donde a bajas concentraciones se mantenía una supervivencia alrededor del 90% mientras que con concentraciones superiores esta disminuía, especialmente con la concentración máxima de 100 µL/mL (Balaji Ganesh et al., 2025).

En la Figura 35, se realizó el análisis por cepa y tipo de HAp:Eu³⁺ para observar los efectos de la concentración de los tratamientos en la viabilidad de los embriones tratados. Los resultados indican que ambas cepas de pez cebra mostraron diferencias significativas entre los grupos tratados con la máxima concentración de nanopartículas con respecto a los demás grupos. La sensibilidad de los embriones ante los nanomateriales sintetizados no varía entre las cepas utilizadas para los experimentos ni se mostraron diferencias observables en el desarrollo de los embriones y larvas tratados, resultados semejantes fueron reportados por de Souza (2023) y colaboradores al estudiar los efectos toxicológicos en embriones y larvas de pez cebra de biomateriales basados en HAp, donde la viabilidad embrionaria tampoco dependía de las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales como: el porcentaje de cristalinidad, la porosidad, el tamaño de nanopartícula y el área superficial; manteniendo tasas de mortalidad menores al 20% (de Souza et al., 2023).

Los resultados del presente trabajo pueden ser atribuibles a la tendencia de los nanomateriales sintetizados a formar agregados, lo que aumenta la polidispersión y limita la endocitosis, así como a la precipitación de los nanomateriales al fondo de los pocillos, los cuales se asocian a su vez con una menor internalización en los embriones (Anexo G). Sin embargo, en algunas réplicas se pudo observar la penetración de los nanomateriales hacia las células internas del embrión mediante microscopía confocal, las imágenes se encuentran en el Anexo H.

Estos hallazgos sugieren que bajo las condiciones evaluadas, las HAp:Eu³⁺ inducen efectos en la supervivencia de los embriones dependientes de la dosis para los experimentos por la técnica de exposición oral.

Los ensayos realizados mediante microinyección en embriones de pez cebra Fli no mostraron diferencias significativas en la mortalidad ni en las condiciones evaluadas, independientemente de la hora de microinyección, concentración, ni tipo de HAp:Eu³⁺. Sin embargo, la dosis máxima utilizada en esta técnica fue de 1 mg/mL, considerablemente mayor a las reportadas en estudios donde es utilizada la técnica (Basnet et al., 2021). A pesar de ello no se observó disminución significativa en la viabilidad embrionaria hasta las 96 hpf, lo que sugiere que las HAp:Eu³⁺ mantienen un perfil de biocompatibilidad incluso a dosis elevadas ya que no generan malformaciones ni alteraciones severas de manera significativa en el desarrollo temprano.

4.4.1.2 Ensayos en larvas de pez cebra

Los ensayos en larvas de pez cebra no mostraron diferencias significativas en las gráficas de mortalidad entre los grupos tratados con distintas concentraciones de los nanomateriales y los controles, ni se observaron efectos toxicológicos evidentes, ya que las larvas permanecieron activas y con un desarrollo normal hasta finalizar los experimentos. Estos hallazgos sugieren que, bajo las condiciones evaluadas, las no se presentan efectos tóxicos atribuibles a las HAp: Eu³⁺. No obstante, al contrastar con lo reportado en la literatura, donde se señala que las moléculas de interés pueden penetrar a través de la piel de las larvas debido a su extrema delgadez, los resultados podrían asociarse a que los nanomateriales no logran atravesar dicha barrera, siendo más efectiva la exposición en etapas más tempranas del desarrollo.

Capítulo 5. Conclusiones

5.1 Conclusiones

En la presente investigación se sintetizaron nanomateriales luminiscentes de HAp:Eu³⁺ por los métodos de combustión e hidrotérmal, los cuales pueden ser excitados con 394 nm y emitir en rojo (620 nm). Además presentaron un segundo pico de excitación en el infrarrojo cercano, ubicado dentro de la primera ventana biológica del organismo.

Se estudiaron las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales luminiscentes, hidroxiapatita dopada con Europio al 5%, verificando así su morfología, cristalinidad y composición química.

Con los estudios anteriores se seleccionaron dos candidatos obtenidos por los métodos de síntesis por combustión e hidrotérmal, nanopartículas y nanorods respectivamente, para los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Mediante los ensayos *in vivo* de viabilidad celular para las nanopartículas y los nanorods, se determinaron los efectos citotóxicos en diferentes líneas celulares. Los resultados obtenidos sugieren que la viabilidad celular es dependiente de la dosis empleada.

Así mismo, mediante los ensayos de generación de especies reactivas de oxígeno en fibroblastos humanos, se comprobó la generación de ROS asociada al Europio presente en los nanorods sintetizados.

Mediante los ensayos *in vitro* en embriones y larvas de pez cebra se comprobó que debido a que los materiales se precipitan al fondo de los pocillos, el efecto citotóxico de los mismos se ve sesgado. Sin embargo, se presentó internalización celular en las primeras horas post-tratamiento en algunos embriones descorionados. Estos resultados sugieren la característica de biocompatibilidad a los nanomateriales sintetizados en las concentraciones probadas.

Estos nanomateriales mostraron propiedades óptimas para su aplicación en osteogénesis y angiogénesis, así como en bioimagen, por lo que se considera como un potencial candidato en teragnosis.

5.2 Perspectivas

Diversos factores en los métodos de síntesis pueden ser mejorados con el fin de obtener nanomateriales de alta pureza, como la verificación de los precursores, el mantenimiento de los hornos en el laboratorio y la disposición de los materiales utilizados.

La técnica de excitación por dos fotones permitirá realizar experimentos *in vitro* de internalización celular, así como en los experimentos *in vivo* con el fin de aprovechar las propiedades ópticas de este tipo de materiales como son su seguimiento en tiempo real. Las imágenes obtenidas por esta técnica se presentan en el Anexo I.

Por otra parte, para comprobar dónde se posicionan los iones de Eu^{3+} al dopar la red de hidroxiapatita es posible recurrir al cálculo de primeros principios mediante la Teoría del Funcional de la Densidad, DFT por sus siglas en inglés (Density Functional Theory), dicha teoría se basa en el cálculo de la energía total del sistema a partir de la densidad electrónica.

Con el fin de ampliar los experimentos en el modelo de pez cebra, se puede recurrir al uso de cepas transgénicas que presenten fluorescencia en vasculatura y eritrocitos (*fli1a*, *gata1:dsRed*, *lmo2:dsRed2*), para estudiar los efectos asociados a la angiogénesis, evaluando así nueva vasculatura que además sea funcional. Así como los ensayos de regeneración ósea puesto que el pez cebra posee la característica de regenerar tejido óseo en sitios como la aleta caudal y el cráneo.

Así mismo, la liberación de Europio de manera controlada requiere estudiarse debido a que posee propiedades duales asociadas a la generación de especies reactivas de oxígeno. El Europio también es bactericida por lo que tiene potenciales aplicaciones en el tratamiento infecciones relacionadas con el tejido óseo. Así mismo, es necesario continuar el estudio de los efectos del Europio en cuanto a la bioseguridad, respuesta inmune, distribución biológica y efectos metabólicos.

El uso de nanomateriales luminiscentes combinados con andamios tiene aplicaciones prometedoras en regeneración de tejidos puesto que mejora las propiedades bioactivas y funcionalidad de los biomateriales convencionales, convirtiéndolos en potenciales candidatos para teragnosis.

Literatura citada

- Balaji Ganesh, S., Aravindan, M., Kaarthikeyan, G., Martin, T. M., Kumar, M. S. K., & Chitra, S. (2025). Embryonic toxicology evaluation of novel *Cissus quadrangularis*, bioceramics and tendon extracellular matrix incorporated scaffolds for periodontal bone regeneration using zebrafish model. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 15(3), 563–569. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2025.03.009>
- Basnet, R. M., Zizioli, D., Muscò, A., Finazzi, D., Sigala, S., Rossini, E., Tobia, C., Guerra, J., Presta, M., & Memo, M. (2021). Caffeine inhibits direct and indirect angiogenesis in zebrafish embryos. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094856>
- Blasse, G. (1994). *Luminescent Materials*_Blasse and Grabmaier. Springer.
- Damiri, F., Fatimi, A., Magdalena Musuc, A., Paiva Santos, A. C., Paszkiewicz, S., Igwe Idumah, C., Singh, S., Varma, R. S., & Berrada, M. (2024). Nano-hydroxyapatite (nHAp) scaffolds for bone regeneration: Preparation, characterization and biological applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 95, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105601>
- de Souza, A. M., Araujo-Silva, H., Costa, A. M., Rossi, A. L., Rossi, A. M., Granjeiro, J. M., Luchiari, A. C., & Batistuzzo de Medeiros, S. R. (2023). Embryotoxicity and visual-motor response of functionalized nanostructured hydroxyapatite-based biomaterials in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 313, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137519>
- Du, P., Wei, Y., Liang, Y., An, R., Liu, S., Lei, P., & Zhang, H. (2024). Near-Infrared-Responsive Rare Earth Nanoparticles for Optical Imaging and Wireless Phototherapy. In *Advanced Science* (Vol. 11, Issue 8). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/advs.202305308>
- Efrén, J., & Yumi, S. (2022). *Materiales y nanomateriales. principios, aplicaciones y técnicas de caracterización*. ESPOCH. <https://www.researchgate.net/publication/363542369>
- Entradas, T., Waldron, S., & Volk, M. (2020). The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 204, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111787>
- Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., Canto Pingarrón, M. del, & Blanco Jerez, L. (2004). Medicina oral, patologíã oral y cirugíã bucal. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 11(2), 151–157. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-69462006000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Flores-Luna, R. I. (2023). *UD 2-El aparato locomotor 2.1 Sistema óseo-articular*.
- Gillman, C. E., & Jayasuriya, A. C. (2021). FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 130, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112466>
- Haque, E., & Ward, A. C. (2018). Zebrafish as a model to evaluate nanoparticle toxicity. *Nanomaterials*, 8(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nano8070561>

- Iconaru, S. L., Motelica-Heino, M., & Predoi, D. (2013). Study on europium-doped hydroxyapatite nanoparticles by fourier transform infrared spectroscopy and their antimicrobial properties. *Journal of Spectroscopy*, 1(1). <https://doi.org/10.1155/2013/284285>
- Kargozar, S., Baino, F., Hamzehlou, S., Hamblin, M. R., & Mozafari, M. (2020). Nanotechnology for angiogenesis: Opportunities and challenges. *Chemical Society Reviews*, 49(14), 5008–5057. <https://doi.org/10.1039/c8cs01021h>
- Lafita, J. (2003). Fisiología y patología ósea. *An. Sist. Sanit. Navar*, 26, 7–15. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272003000600002>
- Levasseur, R. (2019). Fisiología del tejido óseo. *EMC - Podología*, 21(3), 1–25. [https://doi.org/10.1016/s1762-827x\(19\)42712-0](https://doi.org/10.1016/s1762-827x(19)42712-0)
- Liu, M., Shu, M., Yan, J., Liu, X., Wang, R., Hou, Z., & Lin, J. (2021). Luminescent net-like inorganic scaffolds with europium-doped hydroxyapatite for enhanced bone reconstruction. *Nanoscale*, 13(2), 1181–1194. <https://doi.org/10.1039/d0nr05608a>
- Liu, X., Zhao, M., Lu, J., Ma, J., Wei, J., & Wei, S. (2012). Cell responses to two kinds of nanohydroxyapatite with different sizes and crystallinities. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1239–1250. <https://doi.org/10.2147/IJN.S28098>
- Malacara, D. (2015). *Óptica básica* (3° ed.). Fondo de cultura económica.
- Malhotra, A., & Habibovic, P. (2016). Calcium Phosphates and Angiogenesis: Implications and Advances for Bone Regeneration. *Trends in Biotechnology*, 34(12), 983–992. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.07.005>
- Mandavilli, B. S., Aggeler, R. J., Schwenger, T., Yan, M., Langsdorf, C., Tennico, Y., Chol Kang, H., Gee, K., Janes, M. S., & Janes, M. S. (2011). Cell-based measurements of oxidative stress with a new near infrared emitting probe for ROS Applications for multiplexed evaluation of cell health. In *life technologies TM*. <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/files/cell-analysis/pdfs.par.78244.file.dat/cellrox-imaging-flow-cytometry-sfrbm-2011.pdf>
- Natarajan, D., Ye, Z., Wang, L., Ge, L., & Pathak, J. L. (2022). Rare earth smart nanomaterials for bone tissue engineering and implantology: Advances, challenges, and prospects. In *Bioengineering and Translational Medicine* (Vol. 7, Issue 1, pp. 1–33). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/btm2.10262>
- OECD. (2025). *Test No. 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- Organización Mundial de la Salud. (2021). *Trastornos musculoesqueléticos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/musculoskeletal-conditions>
- Patil, K. C., Hedge, M. S., Rattan, T., & Aruna, S. T. (2008). *Chemistry of Nanocrystalline Oxide Materials. Combustion Synthesis, Properties and Applications*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Patra, C. R., Kim, J. H., Pramanik, K., D'Uscio, L. V., Patra, S., Pal, K., Ramchandran, R., Strano, M. S., & Mukhopadhyay, D. (2011). Reactive oxygen species driven angiogenesis by inorganic nanorods. *Nano Letters*, 11(11), 4932–4938. <https://doi.org/10.1021/nl2028766>

- Pawley, J. B. . (2006). *Handbook of biological confocal microscopy* (J. B. Pawley, Ed.; 3rd ed.). Springer.
- Pontes, L. M., de Faria, J. V. G., Grespi, M. G. M., Rocha, L. A., & Nassar, E. J. (2024). AgNPs incorporated in Eu(III)-doped hydroxyapatite biomaterial: Spectroscopic, cytotoxicity, and antimicrobial investigation. *Optical Materials: X*, 21, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.omx.2023.100286>
- Portal-Núñez, S., Lozano, D., de la Fuente, M., & Esbrit, P. (2012). Fisiopatología del envejecimiento óseo. *Revista Espanola de Geriatria y Gerontologia*, 47(3), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2011.09.003>
- Ray Tjeh Lim, Q., Yi Cheng, X., & Yi Wee, C. (2023). An Insight to the Various Applications of Hydroxyapatite. *Advanced Materials Science and Technology*, 5(2), 0–0. <https://doi.org/10.37155/2717-526x-0502-1>
- Reimer, L., & Kohl, H. (2008). *Transmission Electron Microscopy* (W. T. Rhodes & T. W. Hänsch, Eds.; Fifth Edition). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-34758-5>
- Rouquerol, J., Avnir, D., Fairbridge, C. W., Everett, D. H., Haynes, J. H., Pernicone, N., Ransay, J. D. F., Sing, K. S. W., & Unger, K. K. (1994). *Recommendations for the characterization of porous solids*. <https://list.iupac.org/publications/pac/1994/pdf/6608x1739.pdf>
- Sengar, P. (2017). *Development of nanophosphors for deep photodynamic therapy and radiation dosimetry applications*. [Tesis de Doctorado en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California].
- Sengar, P., Juárez, P., Verdugo-Meza, A., Arellano, D. L., Jain, A., Chauhan, K., Hirata, G. A., & Fournier, P. G. J. (2018). Development of a functionalized UV-emitting nanocomposite for the treatment of cancer using indirect photodynamic therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0344-3>
- Shindo, D., & Hiraga, K. (1998). *High-Resolution Electron Microscopy for Materials Science*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-68422-0>
- Sundarabharathi, L., Parangusan, H., Ponnamma, D., Al-Maadeed, M. A. A., & Chinnaswamy, M. (2018). In-vitro biocompatibility, bioactivity and photoluminescence properties of Eu³⁺/Sr²⁺ dual-doped nano-hydroxyapatite for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 106(6), 2191–2201. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34023>
- Thermo Fisher Scientific. (2010). *CellROX® Oxidative Stress Reagents | 2 CellROX® Deep Red Reagent CellROX® Orange Reagent CellROX® Green Reagent H 2-DCFDA* Dihydroethidium (DHE)*. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10422.pdf>
- TSU en Urgencias Médicas. (n.d.). *Anatomía y Fisiología del Aparato músculo-esquelético y/o locomotor*. Retrieved August 21, 2025, from https://dmd.unadmexico.mx/contenidos/DCSBA/BLOQUE2/UM/01/UAFI1/unidad_02/descargables/UAFI1_U2_Contenido.pdf
- Universidad Veracruzana. (2018). *Sistema esquelético: funciones. huesos: estructura y clasificación. histología del tejido óseo: células, tejido óseo compacto y tejido óseo esponjoso. formación y crecimiento de los huesos. divisiones del sistema esquelético. principales huesos de las diferentes regiones del esqueleto*. <https://www.uv.mx/personal/cblazquez/files/2012/01/sistema-oseo.pdf>

- Valenti, M. T., Marchetto, G., Mottes, M., & Carbonare, L. D. (2020). Zebrafish: A suitable tool for the study of cell signaling in bone. In *Cells* (Vol. 9, Issue 8, pp. 1–14). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells9081911>
- Vega-Zerpa, M. F., Briceño, S., Bahamonde-Duarte, J., Vizuete, K., Debut, A., Uribe, R., Borrero-González, L. J., & González, G. (2025). Optical and structural properties of Europium-doped hydroxyapatite. *Ceramics International*, *51*(12), 16442–16453. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2024.07.235>
- Wu, L., Yang, F., Xue, Y., Gu, R., Liu, H., Xia, D., & Liu, Y. (2023). The biological functions of europium-containing biomaterials: A systematic review. In *Materials Today Bio* (Vol. 19). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100595>
- Xia, L., Zhou, C., Li, Q., Liu, L., Jiang, C., Dai, H., Zhang, H., Zhao, J., & Liang, W. (2025). Nanotechnology in Orthopedic Care: Advances in Drug Delivery, Implants, and Biocompatibility Considerations. *International Journal of Nanomedicine*, *20*, 9251–9274. <https://doi.org/10.2147/IJN.S523462>
- Xing, Q., Zhang, X., Wu, D., Han, Y., Nirmali Wickramaratne, M., Dai, H., & Wang, X. (2019). Ultrasound-Assisted Synthesis and Characterization of Heparin-Coated Eu³⁺ Doped Hydroxyapatite Luminescent Nanoparticles. *Colloids and Interface Science Communications*, *29*, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2019.01.001>
- Yan-Zhong, Z., Yan-Yan, H., Jun, Z., Shai-Hong, Z., Zhi-You, L., & Ke-Chao, Z. (2011). Characteristics of functionalized nano-hydroxyapatite and internalization by human epithelial cell. *Nanoscale Research Letters*, *6*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-600>
- Yoshida, Y. G., Yan, S., Xu, H., & Yang, J. (2023). Novel metal nanomaterials to promote angiogenesis in tissue regeneration. *Engineered Regeneration*, *4*(3), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2023.03.008>
- Zantye, P., Fernandes, F., Ramanan, S. R., & Kowshik, M. (2019). Rare Earth Doped Hydroxyapatite Nanoparticles for In Vitro Bioimaging Applications. *Current Physical Chemistry*, *9*(2), 94–109. <https://doi.org/10.2174/1877946809666190828104812>
- Zavala-Sanchez, L. A., Hirata, G. A., Novitskaya, E., Karandikar, K., Herrera, M., & Graeve, O. A. (2015). Distribution of Eu²⁺ and Eu³⁺ Ions in Hydroxyapatite: A Cathodoluminescence and Raman Study. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, *1*(12), 1306–1313. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00378>
- Zertuche-Arias, T. (2021). *Desarrollo y evaluación in vitro de hidrogeles con actividad antioxidante para su aplicación en la regeneración ósea* [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3580/1/tesis_Tonatzin%20Zertuche%20Arias_05%20julio%202021%20%281%29.pdf
- Zhao, H., Osborne, O. J., Lin, S., Ji, Z., Damoiseux, R., Wang, Y., Nel, A. E., & Lin, S. (2016). Lanthanide Hydroxide Nanoparticles Induce Angiogenesis via ROS-Sensitive Signaling. *Small*, *12*(32), 4404–4411. <https://doi.org/10.1002/sml.201600291>

Anexo

Anexo A

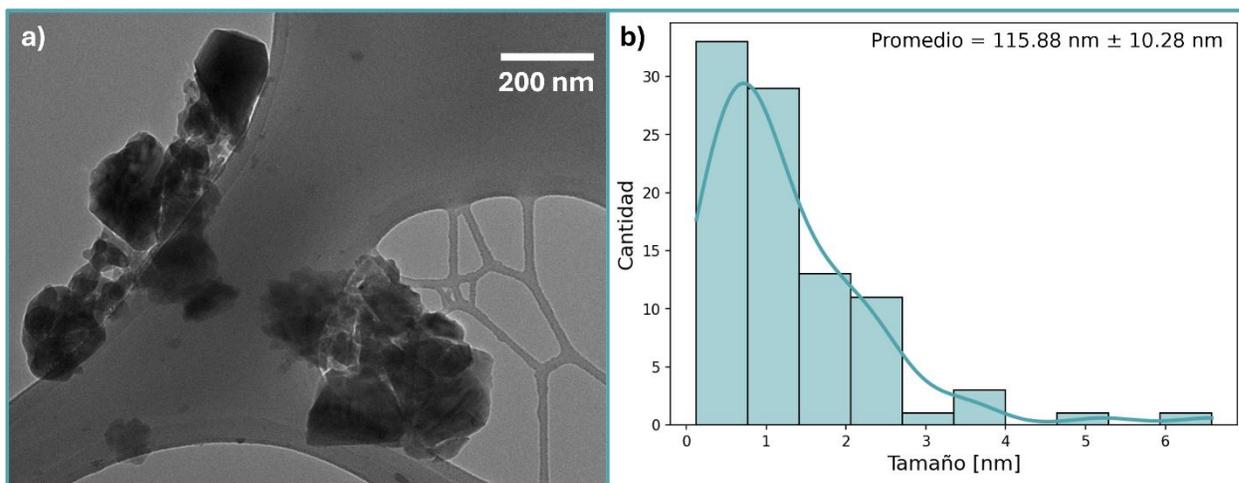


Figura 38. Nanopartículas sintetizadas por el método de combustión, utilizando como combustible la carbohidrazida y tratadas térmicamente a 1100°C . a) micrografía TEM, b) histograma de distribución de tamaños con tamaño promedio de nanopartícula de $115.88 \text{ nm} \pm 10.28 \text{ nm}$.

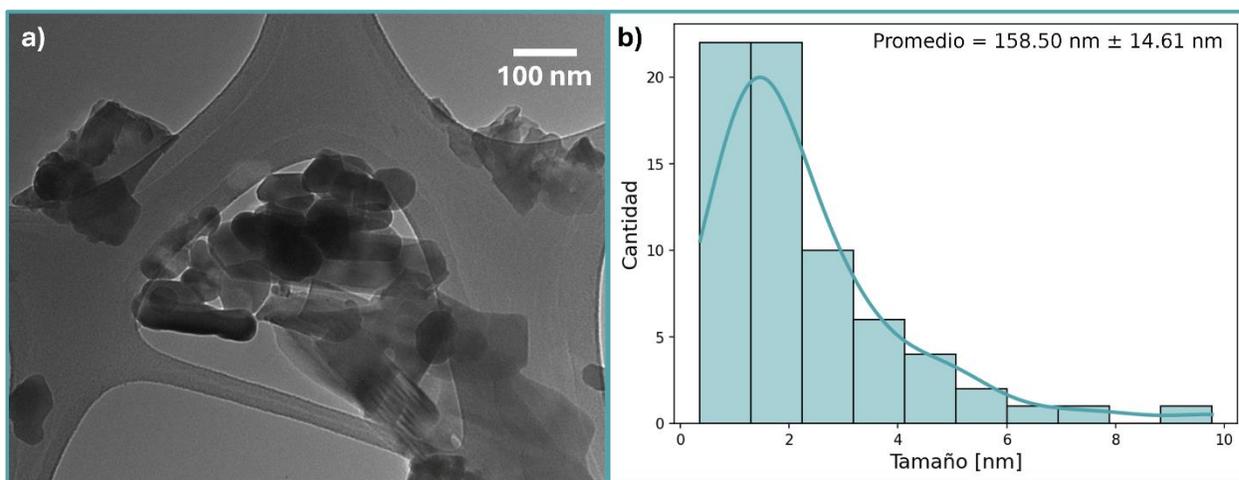


Figura 39. Nanopartículas sintetizadas por el método de combustión, utilizando como combustible la carbohidrazida y tratadas térmicamente a 650°C . a) micrografía TEM, b) histograma de distribución de tamaños con tamaño promedio de nanopartícula de $158.50 \text{ nm} \pm 14.61 \text{ nm}$.

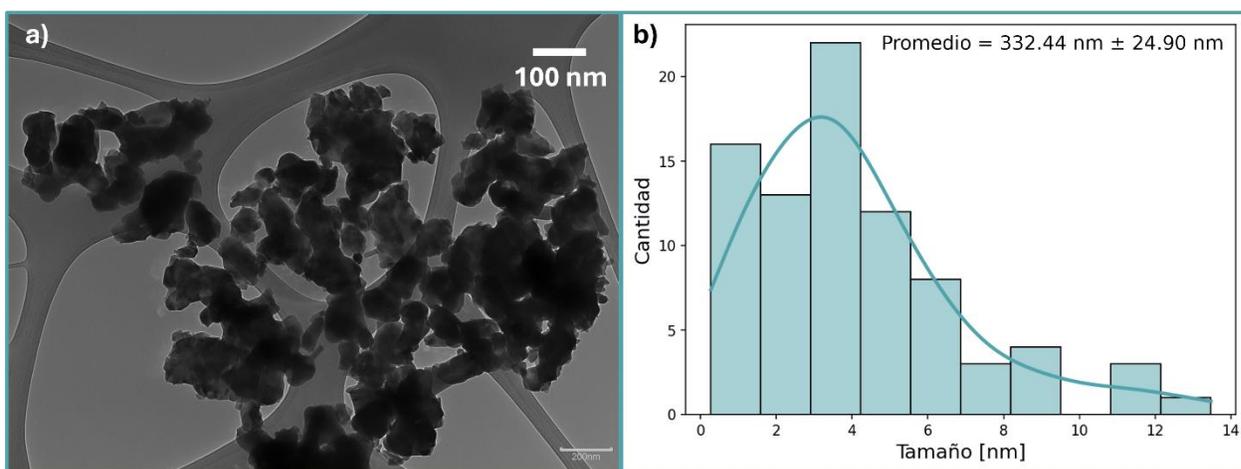


Figura 40. Nanopartículas sintetizadas por el método hidrotérmico, utilizando CTAB y tratadas térmicamente a 650°C. a) micrografía TEM, b) histograma de distribución de tamaños con tamaño promedio de nanopartícula de 332.44 nm ± 24.90 nm.

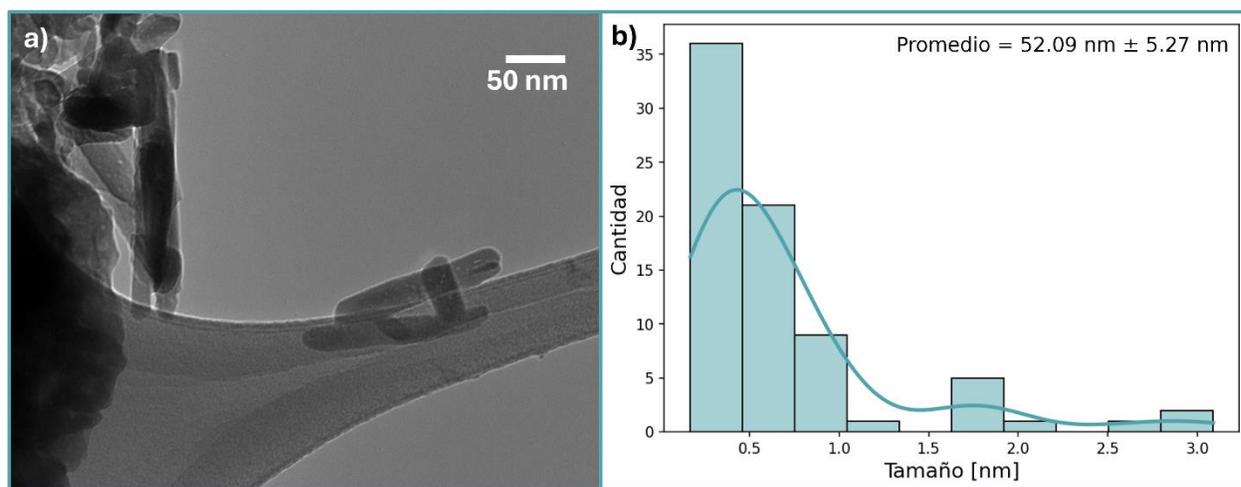


Figura 41. Nanopartículas sintetizadas por el método hidrotérmico y tratadas térmicamente a 200°C. a) micrografía TEM, b) histograma de distribución de tamaños con tamaño promedio de nanopartícula de 52.09 nm ± 5.27 nm.

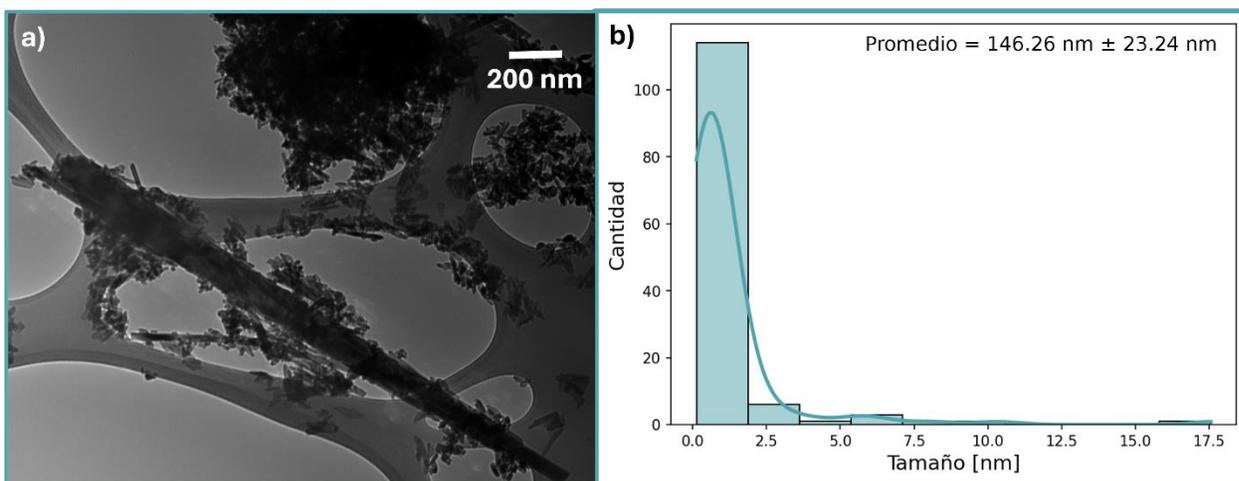


Figura 42. Nanopartículas sintetizadas por el método hidrotermal y tratadas térmicamente a 400°C. a) micrografía TEM, b) histograma de distribución de tamaños con tamaño promedio de nanopartícula de 146.26 nm ± 23.24 nm.

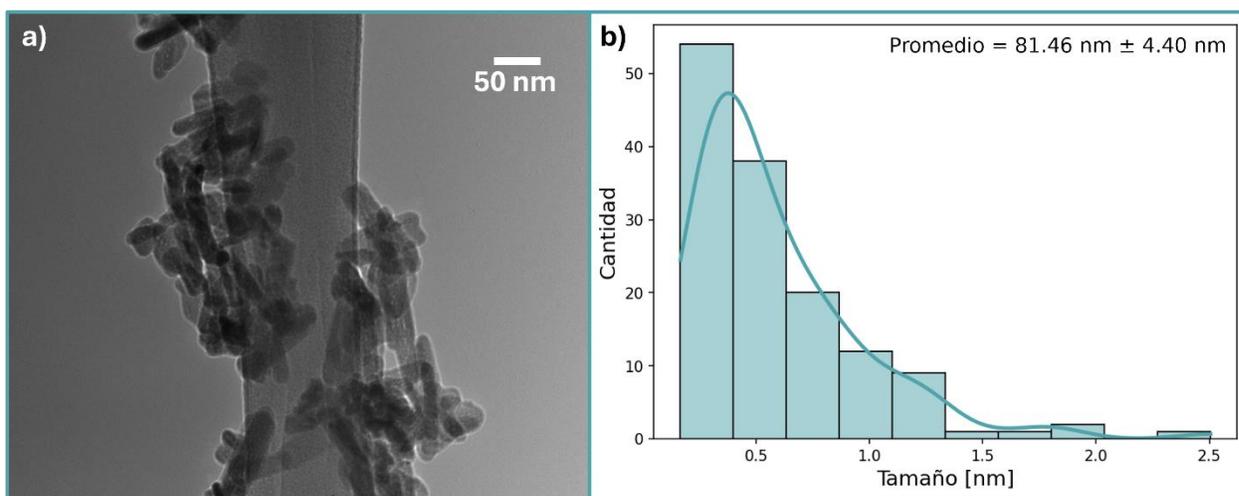
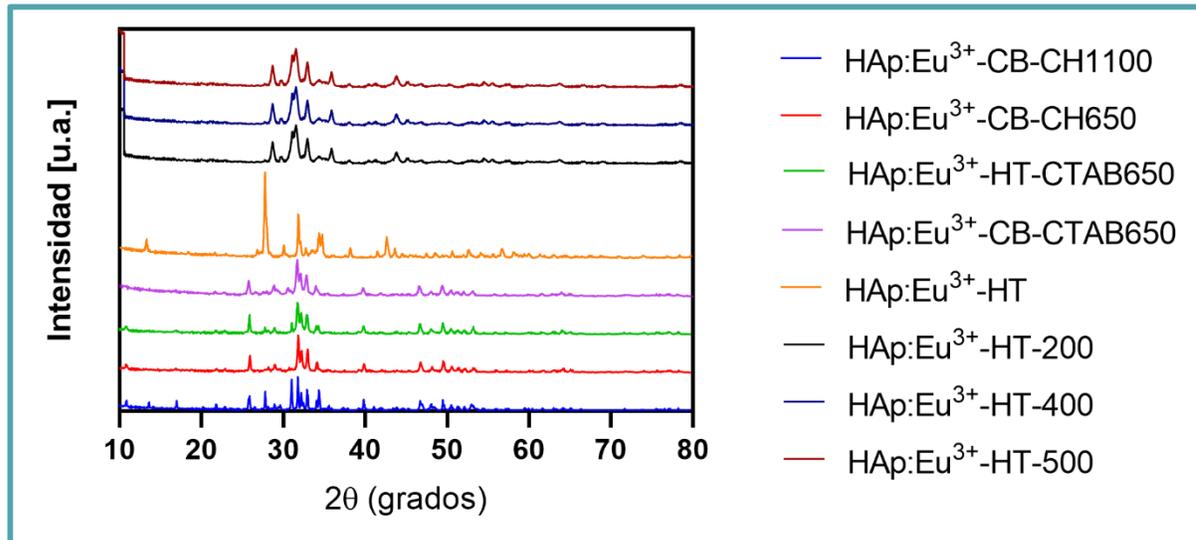
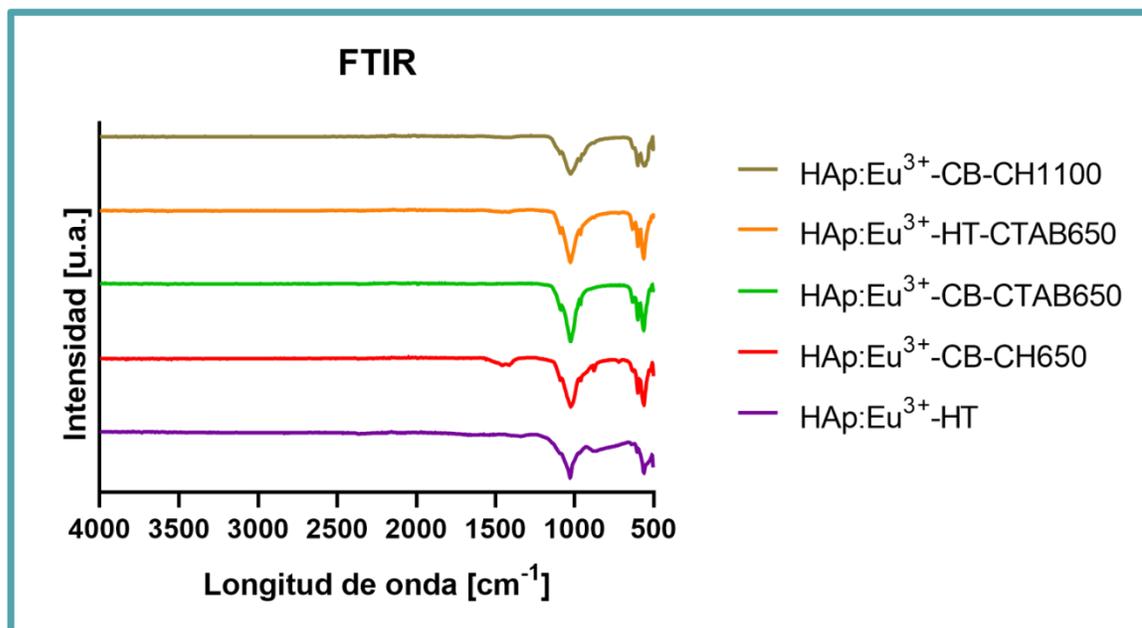


Figura 43. Nanopartículas sintetizadas por el método hidrotermal y tratadas térmicamente a 500°C. a) micrografía TEM, b) histograma de distribución de tamaños con tamaño promedio de nanopartícula de 81.46 nm ± 4.40 nm.

Anexo B

Figura 44. XRD de HAp:Eu³⁺

Anexo C

Figura 45. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier de las HAp:Eu³⁺.

Anexo D

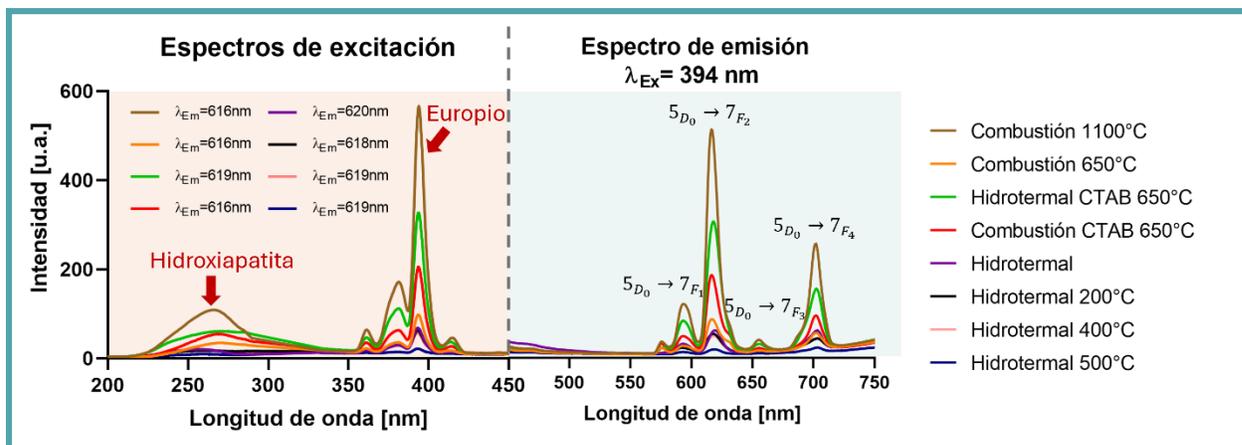


Figura 46. Espectros de fotoluminiscencia de todas las síntesis de HAp:Eu³⁺. Del lado izquierdo, espectro de excitación con las mejores longitudes de onda de emisión para cada HAp:Eu³⁺; del lado derecho, espectro de emisión con la mejor longitud de onda de excitación correspondiente a 394 nm para todas las HAp:Eu³⁺.

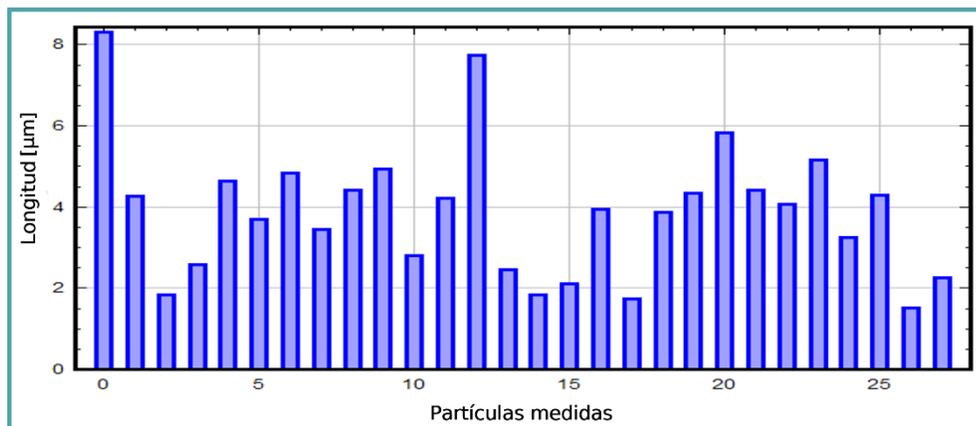
Anexo E

Figura 47. Histograma del tamaño de nanopartículas medidas fuera del embrión en los pocillos tratados. Las nanopartículas se precipitan al fondo de los pocillos de embriones tratados con distintas concentraciones, depositándose rápidamente al fondo debido a su naturaleza metálica.

Anexo F

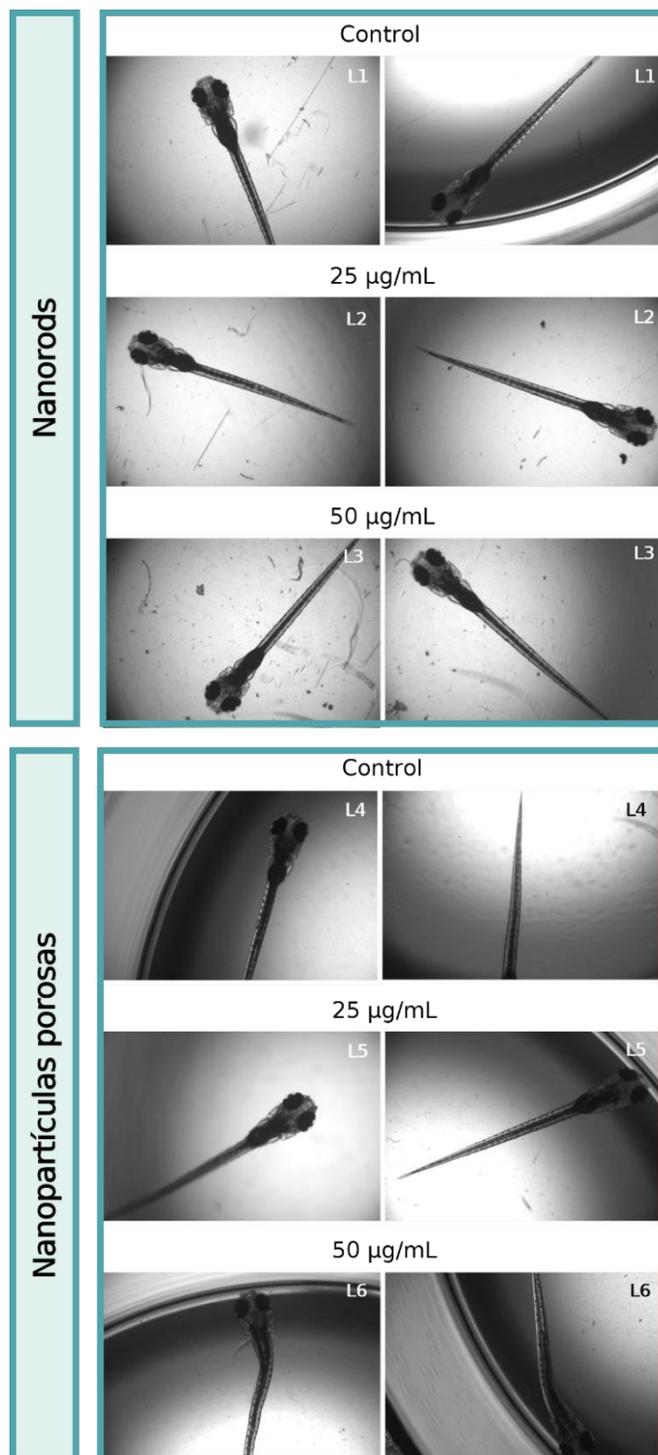


Figura 48. Larvas tratadas con distintas concentraciones de nanopartículas y nanorods a las 96 hpf. Imágenes tomadas con microscopio de las larvas tratadas con distintas concentraciones de nanopartículas y nanorods. No se muestran trastornos del desarrollo en los grupos tratados respecto a los controles.

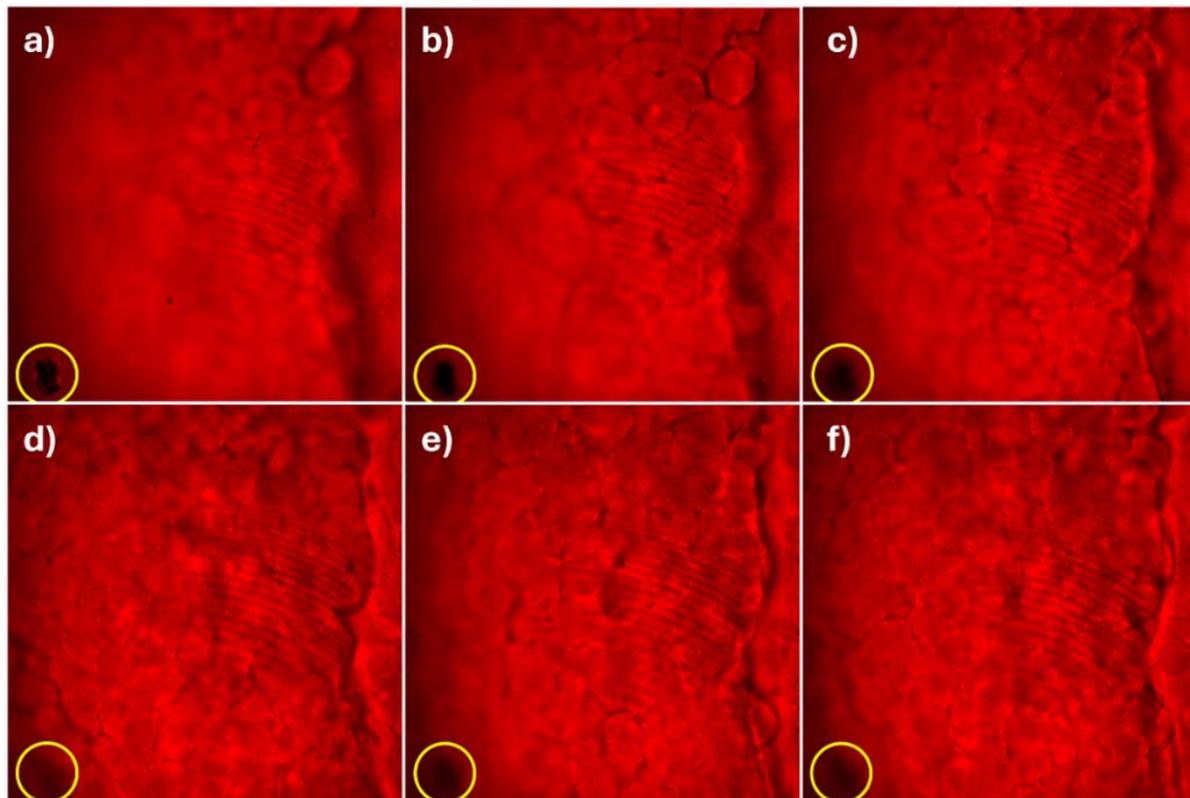
Anexo G

Figura 49. Imágenes por microscopia confocal de fluorescencia de nanopartículas no internalizadas, presentes fuera de embrión WT del ensayo por exposición oral de los nanomateriales. Z-stack de imágenes donde se muestra en el círculo amarillo nanomateriales no internalizados por el corión: a) nanopartícula enfocada en la superficie del embrión, b-f) z-stack mostrando la penetración hacia las células internas del embrión presentándose la nanopartícula fuera de foco, es decir, en la superficie externa del embrión.

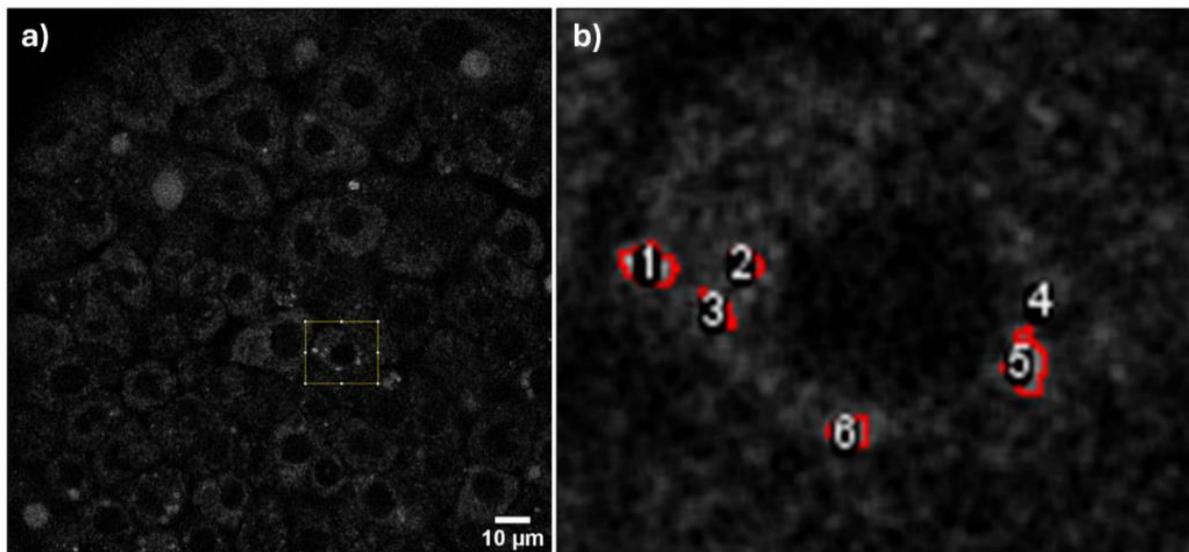
Anexo H

Figura 50. Imágenes por microscopia confocal de fluorescencia de nanomateriales internalizados en embrión WT del ensayo por exposición oral. Z-stack de células externas a internas del embrión de pez cebra expuesto a nanomateriales donde se muestran las nanopartículas internalizadas después de 3 horas de la exposición inicial a los nanomateriales. a) Z-stack de un embrión tratado con nanopartículas donde se toma una porción de las células internas marcado en el recuadro amarillo, b) porción de células internas donde se presentan las nanopartículas internalizadas marcadas en rojo y numeradas 1-6.

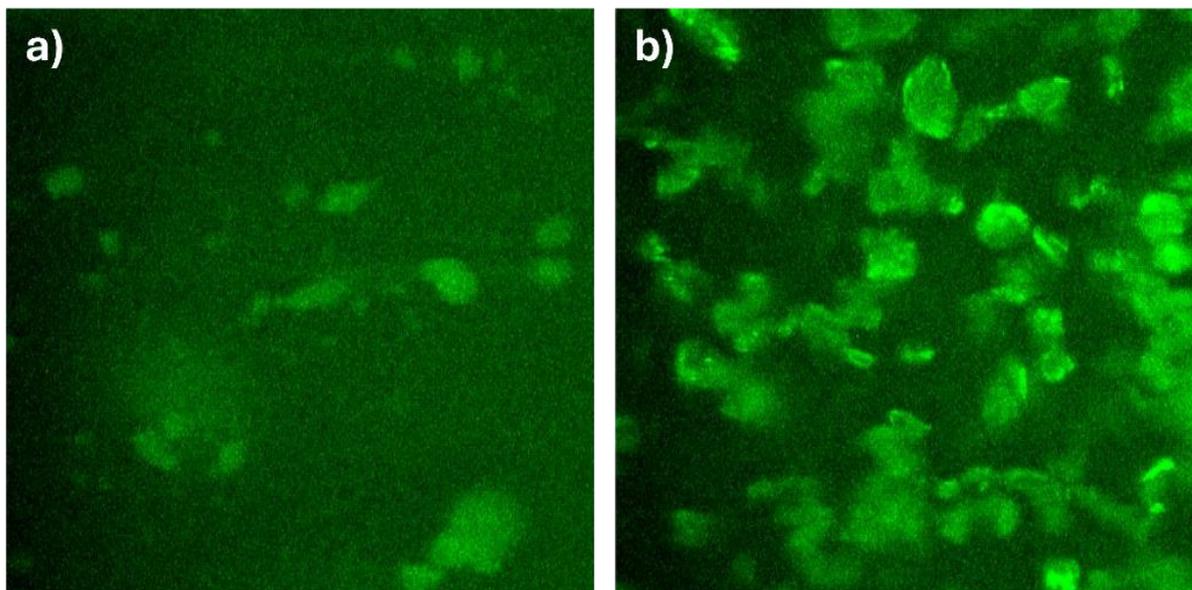
Anexo I

Figura 51. Imágenes obtenidas mediante la técnica de excitación por dos fotones. La longitud de onda de excitación es de 788 nm con un láser ti:zaf, las imágenes fueron obtenidas con un filtro de 620/52 nm. En el a) Nanopartículas, b) nanorods.