





Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias (Nanotecnología)

“Nanobiocatalizador de platino soportado en titania funcionalizada (NPt–fibrosis), para la destrucción de tejido fibrótico pulmonar”

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias (Nanotecnología)

Presenta:

L.A.Q.B. Juan Pedro Ramírez Pedroza

Dirigido por:

Director externo: Dra. Tessy María López Goerne

Director Interno: Dr. Rufino Nava Mendoza

Dra. Tessy María López Goerne
Presidente


Firma

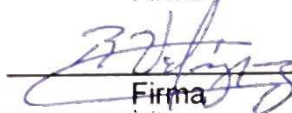
Dr. Rufino Nava Mendoza
Secretario


Firma

Dra. María de los Ángeles Cuán Hernández
Vocal


Firma

Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo
Suplente


Firma

Dra. Daniela Edith Salado Leza
Suplente


Firma


Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de la Facultad de Ingeniería


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre de 2018

RESUMEN

El uso de la nanotecnología en el área médica, tiene cada vez mayor relevancia debido a las grandes ventajas que provee la aplicación de esta ciencia. Cada vez es mayor el interés de encontrar nuevos medicamentos o alternativas que permitan desarrollar tratamientos selectivos, efectivos y personalizado para las diferentes patologías que son de mal pronóstico y para las cuales no existe todavía una cura, como es el caso de las enfermedades fibróticas pulmonares. Como ejemplo de estos materiales se tienen las nanopartículas de dióxido de titanio, ampliamente utilizadas en el área médica por su biocompatibilidad, capacidad de funcionalización entre otras propiedades que los vuelven materiales idóneos para su uso en medicina. El objetivo de este trabajo es desarrollar un material nanoestructurado capaz de matar células pulmonares que promueven el desarrollo de la fibrosis. El material fue sintetizado por el método sol-gel con la intención de modificar a uno previamente utilizado en cáncer cerebral. La caracterización fisicoquímica permitió identificar nanopartículas entre 3 y 15 nanómetros aproximadamente. La evaluación biológica se realizó en fibroblastos provenientes de tejido pulmonar proporcionado por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Esta evaluación permitió encontrar diferencias significativas de su capacidad citotóxica *in vitro*, siendo las más efectivas una de las partículas modificadas. De este material se puede tener un primer indicio de nanopartículas aplicadas a enfermedades pulmonares con una lograda internalización celular, las cuales, deben ser propiamente funcionalizadas, de tal manera para que puedan ser dirigidas únicamente a las células patológicas.

Palabras clave: nanotecnología, medicina, células pulmonares, fibrosis, citotóxica.

SUMMARY

Nanotechnology in medicine has become very relevant due to all the advantages involved in this science. The growing interest to find new drugs or alternatives to develop selective, effective and personalized treatment for prognosis pathologies with no cure as fibrotic pulmonary diseases. One of the most representative materials are titanium dioxide nanoparticles, widely used for medical purposes because of its biocompatibility, surface functionalization capability and some other properties that make it a suitable material for medical sciences. The aim of this work is to develop a nanostructured material capable of killing inductor fibrotic pulmonary cells. This material was synthesized by sol-gel process with the purpose of modifying a previous brain cancer cell material. Physicochemical characterization allowed us to identify nanoparticles ranging between 3 and 15 nanometers. Biological evaluation was performed in fibroblastic cells from pulmonary tissue provided by the Respiratory Disease National Institute. Significant differences were found in its cytotoxic capability *in vitro*, where modified nanoparticles were the most effective. This material could be an indication for applied nanoparticles in pulmonary diseases with successful cellular uptake, which, must be properly functionalized for pointing only pathological cells.

Key words: nanotechnology, medicine, pulmonary cells, fibrosis, cytotoxic.

A mi mamá, María Eugenia Pedroza Bernal, que siempre ha creído en mí y me ha apoyado para realizar todo lo que me he propuesto, además de ser un ejemplo incansable de lucha y perseverancia para lograr mis objetivos y mis metas.

AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos, que siempre han estado en todo momento para apoyarme a pesar de la distancia.

A mi sobrinita Erika, que siempre ha sido una motivación y un ejemplo de lucha constante a pesar de las adversidades, que con su sonrisa refuerza mis ganas de seguir y hacer lo que tanto me gusta

A mis amigos, David, Chava, Bere, que siempre me han apoyado de manera incondicional y han sido cómplices para mis locuras.

A “Dani”, que fue una parte crucial para el desarrollo de esta tesis, y que sin ella, este trabajo habría tenido un contenido muy diferente. Gracias por ser mi cómplice y mentora, por apoyar mis ideas, enseñarme técnicas, conceptos, etc., y sobre todo, por brindarme tu amistad. De verdad tengo que agradecer haber aprendido juntos sobre la ciencia en México, en los grandes institutos y con buenos investigadores

Al Dr. Rufino Nava, por haberme aceptado dentro de su grupo de investigación y apoyarme en todas y cada una de las decisiones que fui tomando a lo largo de la Maestría para así poder forjar mi propio criterio.

A la Dra. Cuán, por siempre mostrarse amable y preocupada por nuestro aprendizaje; por ser un apoyo en cualquier situación adversa.

Al Dr. Rodrigo, que siempre se mostró accesible a todas las dudas e inquietudes, y que con buen humor, siempre tenía una respuesta favorable.

A los diferentes institutos: INER, INCAN, IF-UNAM, UAM-X, UAM-I por abrirme las puertas para poder realizar todos y cada uno de los experimentos que fueron base del trabajo que hoy culmina.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el valiosísimo apoyo otorgado para poder cursar este posgrado y realizar la investigación presentada.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Nanotecnología	1
1.1.1. Historia.....	1
1.1.2. Nanomateriales	1
1.1.3. Efecto de tamaño.....	2
1.1.4. Síntesis de Nanoestructuras	2
1.2. Nanomedicina	3
1.2.1. Ventajas de las nps en medicina	3
1.2.2. Funcionalización de un material	4
1.2.3. Tipos de nps usadas en medicina	4
1.2.4. Teragnóstica	5
1.2.5. Biocompatibilidad.....	5
1.3. Nanobiocatalizadores	6
1.3.1. Generalidades del nanobiocatalizador de platino NPt	7
1.3.2. Proceso sol-gel.....	7
1.4. Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)	8
1.4.1. Fisiopatología de la FPI	9
1.5. Nanomedicina en enfermedades respiratorias	11
1.5.1. Nanoesferas transportadoras de DNA.....	11
1.5.2. Nanoacarreadores con blanco en el endotelio	12
1.5.3. Nanopartículas para transporte de prostaglandina E y siRNA	12
1.5.4. Tendencias en nanomedicina pulmonar	13
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo General	14
3.2. Objetivos Particulares	15
4. METODOLOGÍA	15
4.1. Síntesis NPt-fibrosis	15
4.2. Caracterización Fisicoquímica	17
4.2.1. Microscopía Electrónica Barrido (SEM).....	17
4.2.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	18
4.2.3. Difracción de Rayos X (XRD).....	19
4.2.4. Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR)	19
4.2.5. Espectroscopía Ultravioleta – Visible (UV-vis)	20
4.2.6. Espectroscopía de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS)	21
4.2.7. Análisis Termogravimétrico (TGA)	21
4.2.8. Fisorción de Nitrógeno (BET).....	22

4.3. Caracterización biológica	22
4.3.1. Modelos celulares	22
4.3.2. Condiciones del cultivo celular	23
4.3.3. Ensayo de citotoxicidad (MTT)	24
4.3.3.1. Fundamento	24
4.3.3.2. Preparación de muestras	25
4.3.4. Localización intracelular de nanopartículas	26
4.3.4.1. Fijación de células	27
4.3.4.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	28
4.3.4.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	29
4.3.4.4. Microscopía de Fluorescencia	29
4.3.4.4.1. Time Lapse	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	30
5.1. Caracterización Físicoquímica	31
5.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	31
5.1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	33
5.1.3. Difracción de Rayos X (XRD)	36
5.1.4. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	38
5.1.5. Espectroscopía Ultravioleta (UV-vis)	42
5.1.6. Espectroscopía de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS)	44
5.1.7. Análisis Termogravimétrico (TGA)	46
5.1.8. Fisorción de Nitrógeno (BET)	48
5.2. Caracterización Biológica	49
5.2.1. Citotoxicidad	50
5.2.2. Localización intracelular de nanopartículas	52
5.2.2.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	52
5.2.2.2. Microscopía de Fluorescencia	54
5.2.2.2.1. Marcaje de nanopartículas	55
5.2.2.2.2. Time Lapse	55
5.2.2.2.3. Reconstrucción 3D	58
6. CONCLUSIONES	60
7. REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de elementos presentes en la muestra P3.....	32
Tabla 2. Asignación de vibraciones del espectro FTIR para los materiales NPt	41
Tabla 3. Temperaturas de pérdida significativa de material.....	47
Tabla 4. Área superficial para las diferentes muestras NPt	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Nanopartícula con amplia capacidad de funcionalización.	3
Figura 2. Estructura de un acarreador teragnóstico. Adaptada de Caldorera-Moore et al. (2011).Error! Reference source not found..	5
Figura 3. Esquema del proceso fibrótico en la célula epitelial alveolar. Martínez et al., 2017.Error! Reference source not found.....	10
Figura 4. Esquema de la síntesis de las nanopartículas NPt-fibrosis.	16
Figura 5. Subcultivo celular FN4 y HIPF 305.Error! Reference source not found..	24
Figura 6. Muestra la conversión de MTT a formazán mediante su reducción por NADH.	25
Figura 7. Planeación experimental del ensayo de citotoxicidad con MTT..	26
Figura 8. Mecanismo de acción del glutaraldehído y tetraóxido de Osmio sobre la membrana celular de los fibroblastos en el proceso de fijación. a) Membrana celular sin tratamiento. b) Unión de los agentes de fijación a los componentes de la membrana celular.	27
Figura 9. Planeación para la fijación de células post exposición a las nanopartículas P3 y P9.Error! Reference source not found.	28
Figura 10. Marcaje de Nanopartículas con RhB – ITC a través del grupo amino del GABA.....	30
Figura 11. Micrografías SEM de a) NPt-P3 y b) NPt-P9.Error! Reference source not found.	31
Figura 12. Análisis EDS del material NPt-P3.	32
Figura 13. Micrografías TEM y HRTEM de los materiales Ca, P3 y P9.Error! Reference source not found..	33
Figura 14. Micrografías TEM de nanopartículas en solución con medio de cultivo.Error! Reference source not found..	35
Figura 15. Difractogramas comparativos de los nanocristales. a) Muestras Ca, P3 y P9. b) Muestras RCa, RP3 y RP9.....	36
Figura 16. Espectro FTIR obtenido por la técnica de ATR de las nanopartículas R, Ca, P3 y P9, así como de los precursores GABA y Pt(acac) ₂ . Región espectral 600 – 1800 cm ⁻¹	38

Figura 17. Espectro FTIR obtenido por la técnica de transmisión con KBr de las nanopartículas R, Ca, P3 y P9. Región espectral 2400 – 3100 cm ⁻¹ .Error! Reference source not found..	39
Figura 18. Espectro FTIR obtenido por la técnica de transmisión con KBr de las nanopartículas NPt-R, RP3, RP9, P3, P9. Región espectral 400 – 700 cm ⁻¹ .Error! Reference source not found..	40
Figura 19. Barrido de absorción UV-Vis de 200 – 800 nm de las muestras Ca, P3 y P9.....	42
Figura 20. Espectro general de barrido XPS de los materiales NPt – Ca, P3 y P9.Error! Reference source not found.....	44
Figura 21. Espectro general de barrido XPS de los materiales NPt – RCa, RP3 y RP9.Error! Reference source not found.	45
Figura 22. Curvas TGA y DTA de los materiales NPt-R, P3 y P9 obtenidas a una tasa de calentamiento de 10°C/min.....	46
Figura 23. Isoterma de adsorción-desorción de N ₂ a 77°K.Error! Reference source not found.....	48
Figura 24. Evaluación citotóxica de los materiales R, Ca, P3 y P9 en a) células FN4 y b) células HIPF 305 mediante el ensayo MTT.	50
Figura 25. Micrografías TEM de células sin y con exposición de material P3 a concentración 40 µg/ml.Error! Reference source not found..	52
Figura 26. Daño celular con nanopartículas internalizadas. a) Se muestra fibroblasto pulmonar con vacuolas de diferentes tamaños y nanopartículas internalizadas (a). Se observa pérdida de la continuidad en la membrana celular (b), nanopartículas de diferentes tamaños internalizadas (c), comparativo con imágenes HRTEM de nanopartículas dispersas en agua (d) y una vista con mayor acercamiento a las mismas donde se aprecian características de cristalinidad en ellas (e).....	53
Figura 27. Microscopía de Transmisión y Fluorescencia del material P3 funcionalizado con RhB-ITC. Se observan los canales de a) transmisión, b) fluorescencia y c) superposición de los dos anteriores.	55
Figura 28. Secuencia de desplazamiento de un aglomerado de nanopartículas al núcleo. Se muestran 6 diferentes tiempos, partiendo desde el inicio de la incubación (00:00), hasta cuando la partícula es transportada en dirección nuclear (1:40). Además, partículas fuera de la célula (00:00), señaladas en un círculo, son alcanzadas por prolongaciones celulares y desplazadas de su sitio original (01:40)..	57

Figura 29. Reconstrucción 3D que muestra localización intracelular de aglomerados de nanopartículas. Error! Reference source not found. 58

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Nanotecnología

1.1.1. Historia

Aunque la palabra “nanotecnología” es relativamente nueva, la nanotecnología ha estado presente de manera conceptual a través del tiempo, como en la antigua Grecia, donde Demócrito describía que todo en el universo estaba compuesto por partículas muy pequeñas llamadas átomos.

A finales de 1959, un físico norteamericano llamado Richard Feynman publicó un artículo llamado: “Hay mucho espacio en el fondo”, donde expresaba la idea de poder manipular la materia átomo por átomo, es decir, a escala atómica. Años después, en 1974, el científico Norio Taniguchi en su escrito sobre máquinas de alta precisión empleó por primera vez el concepto de “nanotecnología”. El mismo año, la compañía IBM patentó este equipo. En 1981, Eric Drexler publicó el primer artículo sobre nanotecnología molecular.

1.1.2. Nanomateriales

Se conforman de nanopartículas (nps) con dimensiones entre 1 y 100 nanómetros (nm). Con esta escala usualmente se miden los átomos y las moléculas, por ejemplo, 6 átomos de carbono unidos tienen un ancho de 1 nm. Pueden tener diferentes morfologías tales como esferas, barras, alambres, estrellas, etc., (Tao et al., 2017).

Estos nanomateriales se caracterizan por sus propiedades como: incremento en el área superficial al disminuir el tamaño de partícula, mayor resistencia mecánica, cambio en las propiedades magnéticas, capacidad de autoensamblaje, cambio en el potencial de ionización, entre otras. Estas características han permitido lograr un gran auge en aplicaciones a diferentes áreas como: espacial (Divagar et al., 2016), electrónica (Nam et al., 2016), alimentos (He, 2016), seguridad militar (Smith, 2017), ciencias de la salud (D’Agostino et al., 2017), catálisis (López, et al., 2010), etc.

1.1.3. Efecto de tamaño

En nanotecnología, el tamaño afecta las propiedades de los nanomateriales, donde se incluye:

- a) A escalas pequeñas se originan cambios en la energía total del sistema.
- b) La reducción del tamaño cambia la reactividad química del sistema, en función de los niveles electrónicos más externos.
- c) Las propiedades físicas, tales como: eléctricas, ópticas, térmicas y magnéticas dependen del arreglo de los últimos niveles electrónicos.

Lo anterior es causado por efecto en la reducción de las dimensiones y la cantidad de átomos en contacto con la superficie. Si un átomo se localiza en la superficie, el número de átomos vecinos es menor, generando diferencias en el tipo de enlaces que puede formar, así como de su estructura electrónica.

1.1.4. Síntesis de Nanoestructuras

Existen dos tipos principales en la síntesis de nanomateriales:

- 1) **“Bottom-up”**: Los materiales comienzan a sintetizarse desde pequeños grupos de átomos o moléculas por medio de reacciones químicas que reactores específicos propician las condiciones para el crecimiento y ensamblaje específico. En este método, se pueden autoensamblar estructuras para formar otras más complejas
- 2) **“Top-down”**: Parte de materiales grandes que van siendo fragmentados en partículas más pequeñas, mediante herramientas litográficas, mecánicas y químicas. Se requiere además, el uso de un haz de iones o electrones que permita la formación de patrones a nanoescala.

1.2. Nanomedicina

La nanomedicina surge como la rama de la nanotecnología que es aplicada a las ciencias de la salud, la cual, busca efectuar un diagnóstico temprano, prevención y establecer tratamiento, que permitirán comprender el proceso fisiopatológico de la enfermedad y de esa manera, brindar soluciones más eficientes. Como parte demostrativa, se han empleado sistemas nanoestructurados como agentes de contraste, sistemas de liberación controlada, polímeros terapéuticos, entre otros (Gao, 2017).

1.2.1. Ventajas de las nps en medicina

Debido a su composición, forma, tamaño, química de superficie, las nps pueden ser funcionalizadas o revestidas de manera que permitan una mejor interacción con el medio específico a donde se desean aplicar, ya que pueden tener grupos químicos usados en reconocimiento de señales, marcadores tumorales, agentes fluorescentes, protección contra degradación por enzimas, marcar células específicas, etc., (Figura 1).

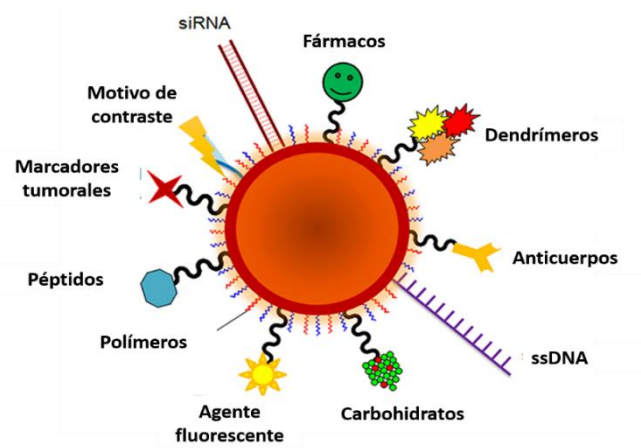


Figura 1. Nanopartícula con amplia capacidad de funcionalización.

La administración de fármacos u otros compuestos en términos de nanomedicina, ha propuesto diversas estructuras que permiten un método menos invasivo, con mayor capacidad para atravesar poros y barreras biológicas, mejor selectividad y el aumento de las concentraciones del medicamento.

1.2.2. Funcionalización de un material

Con el desarrollo de los nanomateriales, han surgido nuevas herramientas que permiten dotarlos de nuevas características (Haider et al., 2017) para poder hacer frente a retos actuales donde el material por sí mismo es incapaz de realizar el objetivo deseado (Ki et al., 2017).

La funcionalización es un proceso mediante el cual se agregan grupos químicos a la estructura del material, lo que le confiere nuevas características mecánicas, químicas y biológicas (Thiruppathi, 2016) que permiten darle cierta especificidad que no tenía anteriormente (Yegin et al., 2017), así como una aplicación más específica como en nanomedicina.

La funcionalización en sistemas de liberación de fármacos confiere ciertas ventajas como: i) la retención del fármaco para su transporte, ii) protección del fármaco ante condiciones propias del organismo como enzimas y pH por mencionar algunas (Paris et al., 2017), iii) aumento en la solubilidad del fármaco, iv) capacidad para funcionar como un fármaco dirigido en un tejido específico, así como tratar de evitar respuesta inmune.

1.2.3. Tipos de nps usadas en medicina

De acuerdo al uso para el que esté destinado un nanomaterial, se han empleado diferentes tipos de nps, ya que, según los grupos que sean añadidos en su superficie, cada una de ellas tendrá un uso y/o efecto específico en el organismo.

Tales nanoestructuras son:

- a)** Nanoacarreadores poliméricos: conjugados poliméricos
- b)** Nanoacarreadores a base de lípidos: micelas, liposomas
- c)** Nanoestructuras de carbono: nanotubos y
- d)** Nanoacarreadores inorgánicos
 - I.** Nanopartículas semiconductoras (Quantum dots QDs)
 - II.** Nanoacarreadores magnéticos
 - III.** Nanoacarreadores basados en óxidos de silicio
- e)** Otros: conjugados fármaco-anticuerpo, complejos DNA-fármaco, etc., (Chen et al., 2016).

1.2.4. Teragnóstica

Actualmente, se ha descrito un área de la nanomedicina que permite una función dual de las nanopartículas, la teragnóstica. Es un término que engloba la posibilidad de usar un mismo sistema de nanopartículas como herramienta diagnóstica y de tratamiento de manera simultánea, que permitirá tener mejores resultados (Astruc, 2015) como se muestra en la Figura 2.

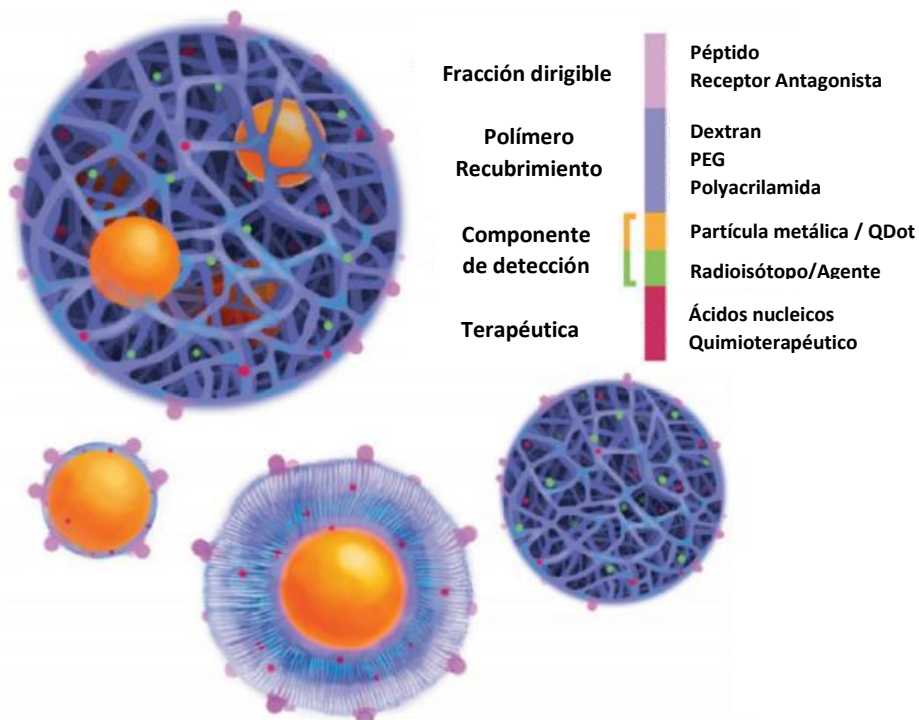


Figura 2. Estructura de un acarreador teragnóstico. Adaptada de Caldorera-Moore et al. (2011).

1.2.5. Biocompatibilidad

Con la finalidad de obtener materiales capaces de adentrarse en el organismo sin provocar alteraciones en el mismo (Sun et al., 2016), se debe atender a la característica de hacer compatible al material con el cuerpo.

La biocompatibilidad se define como “la habilidad de un material de actuar con una adecuada respuesta al huésped, en una aplicación específica” (Meléndez, 2016). Por ello, para garantizar el uso seguro de las nanopartículas en

aplicaciones a la salud, es necesario estudiar y caracterizar las interacciones que existen entre el material y el sistema biológico, empleando técnicas que permitan obtener o simular condiciones similares en el organismo donde será utilizado el nanomaterial (Bobo et al., 2016).

Según la vía de administración de los nanomateriales, es necesario considerar los posibles mecanismos de respuesta inmune del organismo hacia ellos por lo que, al requerirlo, será necesario recubrir el material para que pueda ser entregado en el sitio de interés (Aluani et al., 2017).

La alta biocompatibilidad se logra cuando el material que actúa en el cuerpo no produce toxicidad, inmunogenicidad, trombogenicidad y/o afecciones cancerígenas (Kiew *et al.*, 2016), por lo que hay varios factores a tomar en cuenta para lograr esto:

- a)** Sitio de acción del biomaterial: actúan según su ubicación anatómica (Karakoçak *et al.*, 2016).
- b)** Características intrínsecas de biomaterial: determinan si es biocompatible o no.

Relación riesgo – beneficio entre usar el biomaterial (Wu *et al.*, 2017).

1.3. Nanobiocatalizadores

El concepto de nanobiocatalizador surge de la idea de aplicar materiales catalíticos, como en la refinería del petróleo con la finalidad de obtener subproductos, a cuestiones enzimáticas que tengan un efecto biológico en el organismo (López et al., 2013).

Las nanopartículas con funciones catalíticas orientadas a romper enlaces en las reacciones bioquímicas o componentes celulares de un organismo, se les denomina nanobiocatalizadores. Estas reacciones bioquímicas incluyen enlaces Carbono – Carbono (C-C), Carbono – Nitrógeno y Carbono – Oxígeno (López et al., 2013). Estos enlaces son fundamentales para la vida y por lo tanto también forman parte en algunas patologías. Al usar un nanobiocatalizador que tenga algún efecto en esos enlaces, el material se vuelve altamente selectivo (López et al., 2013). Entre los grupos químicos específicos, que serán el blanco de las

nanopartículas, se tienen las bases nitrogenadas que forman la base del ácido desoxirribonucleico (ADN), cruciales en células cancerígenas, tratando de destruirlas (López et al., 2013; Huo et al., 2017; Rafiei, 2017).

Las primeras nanopartículas desarrolladas como nanobiocatalizadores y poder transformar los enlaces fundamentales de una célula fueron: nanopartículas de platino-titania (NPt) y nanopartículas de cobre-titania (NCu) (López et al., 2013).

Sin duda alguna estamos ante una nueva rama de la nanotecnología, que por su mecanismo de acción y por su tamaño, promete ser una alternativa a numeroso tipo de padecimientos que actualmente no tienen más opción que tratamientos paliativos.

1.3.1. Generalidades del nanobiocatalizador de platino NPt

Las nanopartículas catalíticas denominadas NPt, se forman a partir de una red de titania (TiO₂) con platino (Pt) co-gelado de tamaño nanométrico. Son obtenidas por el método sol – gel, el cual se usa para modificar las propiedades de la materia a escala nanométrica. Debido a su tamaño, las nanopartículas permiten una mejor interacción con las células y sitios específicos para matar células de cáncer, como en el caso del neuroblastoma (Álvarez et al., 2016).

Estas nanopartículas son estables y se han probado ampliamente in vitro e in vivo, lo cual da constancia de su citotoxicidad aplicada y biocompatibilidad.

1.3.2. Proceso sol-gel

Con la finalidad de obtener un material en polvo Es un método químico basado en la preparación de polímeros inorgánicos o cerámicos (materiales óxidos) a partir de una solución con precursores líquidos a un sol y finalmente a un arreglo estructural llamado gel. La formación de un sol ocurre con una dispersión de partículas coloidales sólidas en una fase líquida, mientras que un gel es un sólido formado por dos fases: una sólida que forma una red e inmoviliza la fase líquida (Danks *et al.*, 2016).

En el proceso sol-gel existen diferentes formas de sintetizar un gel, ya que, un mismo precursor puede resultar en diferentes estructuras con tan sólo efectuar pequeños cambios en las condiciones. Para su preparación, este proceso puede resumirse en 6 pasos (Danks *et al.*, 2016):

- 1) Síntesis del sol por hidrólisis y condensación parcial de los alcóxidos.
- 2) Formación del gel por policondensación para formar enlaces *metal-oxo-metal* o *metal-hidroxi-metal*.
- 3) Sinérisis o madurado donde la condensación continúa dentro de la red del gel, en ocasiones encogiéndose y resultando en la expulsión del solvente.
- 4) Secado del gel para formar un xerogel denso con colapso de la red de poros.

Remoción de los grupos de superficie M-OH mediante calcinación a alta temperatura hasta 800 °C (si se requiere).

1.4. Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) afecta principalmente a adultos mayores de 50 años de edad, en su mayoría varones, con una prevalencia de 14 – 43 personas por cada 100,000 habitantes, siendo las más vulnerables aquellas con antecedentes de tabaquismo o exposición a factores de riesgo, como polvo de metales, maderas y sustancias químicas, entre otros (Mejía *et al.*, 2016).

La FPI es una enfermedad terminal con una evolución clínica impredecible, estimando una sobrevida de 3 a 5 años posterior al diagnóstico. Se manifiesta por el agravamiento de signos y síntomas respiratorios, que van limitando la función respiratoria llegando a la falla respiratoria y muerte (Undurraga, 2015).

Los tratamientos actuales para las enfermedades fibróticas pulmonares tienen una función sintomática, ya que no se ha demostrado su eficacia para destruir el tejido cicatrizal, calmando únicamente algunas de las molestias que conlleva la enfermedad.

1.4.1. Fisiopatología de la FPI

La FPI es una enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID) irreversible, asociada al envejecimiento, con opciones terapéuticas muy limitadas y cuya patogénesis no se conoce con precisión. Se ha propuesto recientemente que resulta de una compleja interacción de factores de riesgo genéticos y ambientales, procesos acelerados del envejecimiento del pulmón, y una reprogramación epigenética estocástica, que provoca la activación aberrante de las células epiteliales alveolares, las cuales producen mediadores profibróticos que estimulan el robustecimiento de la población de fibroblastos, su diferenciación a miofibroblastos y la producción de grandes cantidades de matriz extracelular llevando a la destrucción del parénquima pulmonar (Selman et al, 2001; Selman et al, 2014; Selman et al, 2016).

La FPI está asociada al envejecimiento y de hecho casi todas las marcas clave de este proceso están presentes de manera permanente o exagerada, en particular en los neumocitos: acortamiento de telómeros, mitocondrias disfuncionales, inestabilidad genómica, pérdida de proteostasis, senescencia, fallas en la detección de nutrientes y en la comunicación intercelular. En cuanto a factores genéticos, se han descrito varias alteraciones comunes en los casos de FPI familiar; por ejemplo: mutaciones en la proteína surfactante C pueden estar acompañadas de alteraciones en la respuesta del retículo endoplásmico a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés), polimorfismos en el gen de la mucina 5B, así como mutaciones en diversas proteínas involucradas con el mantenimiento de los telómeros (King et al, 2011; Selman et al, 2016; Martinez et al, 2017).

Como respuesta al daño pulmonar, se ha propuesto que, además de que las células mesenquimatosas pulmonares migran, proliferan y sintetizan MEC, parte de los fibroblastos y miofibroblastos provienen de la transición epitelio a mesénquima (TEM) de epiteliales alveolares o mesoteliales, así como de células troncales derivadas de médula ósea y fibrocitos circulantes (Willis et al, 2005; Andersson-Sjöland et al, 2008; Selman et al, 2016). La reepitelización es el proceso por el cual el epitelio alveolar restaura su integridad en condiciones normales. Consta de la proliferación, migración y diferenciación de los neumocitos tipo II a tipo I. En contraste, en la FPI, las células epiteliales pierden

su integridad –probablemente sin daño externo, el cual solía ser considerado como necesario--, y toman uno de cuatro caminos posibles: a) proliferar y migrar cubriendo zonas que tenían un epitelio de neumocitos tipo I, esto es metaplasia, ya sea cuboidal o escamosa, b) entrar a un estado de senescencia, c) morir por apoptosis, o bien, d) perder sus marcadores epiteliales y ganar marcadores de fibroblasto: TEM (Martinez et al, 2017; Xu et al, 2016; Willis et al, 2005).

Se ha encontrado que algunas células epiteliales de FPI presentan marcadores tanto de neumocitos tipo I, como de tipo II y bronquiales. Apparently los neumocitos se mueren o entran en senescencia y un segundo grupo de células progenitoras positivas para queratinas 5 y 14, son las que median la respuesta anómala de reparación favoreciendo la fibrosis y dando lugar a las estructuras conocidas como panal de abeja (Mora et al, 2017; Xu et al, 2016).

Figura 3. Modelo de la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). La integridad del epitelio se ve afectada por factores genéticos, epigenéticos, ambientales y procesos asociados a envejecimiento acelerado, con esto las células epiteliales se activan sintetizando mediadores como citocinas, quimiocinas, metaloproteasas de matriz (MMPs) y moléculas características de vías del desarrollo embrionario, que inducen la proliferación y migración de fibroblastos (fibroblasts) y miofibroblastos (myofibroblasts) quienes producen grandes cantidades de matriz extracelular (MEC).

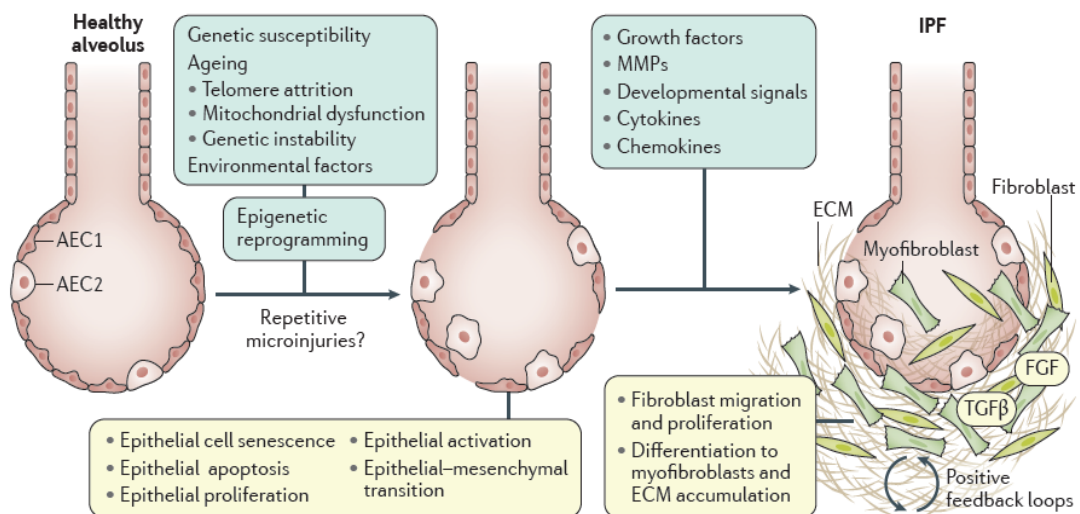


Figura 3. Esquema del proceso fibrótico en la célula epitelial alveolar. Martínez et al., 2017.

1.5. Nanomedicina en enfermedades respiratorias

La investigación multidisciplinaria en nanomedicina ya se usa en el campo de las enfermedades crónicas y en las afecciones pulmonares teniendo aportaciones principalmente en diagnóstico molecular y liberación dirigida de fármacos.

El uso de nanopartículas en el tratamiento para enfermedades pulmonares es relativamente novedoso, debido a que, en su mayoría se daba énfasis a patologías con gran impacto social como el cáncer, o a aquellas relacionadas con el sistema nervioso central, dejando las afecciones del pulmón a los tratamientos convencionales.

Entre los trabajos previos, se reportan en este documento, tres investigaciones que tienen como blanco las células pulmonares como una opción para transportar DNA y controlar la liberación de moléculas específicas en zonas clave de este órgano.

Una de las áreas que actualmente está desarrollando diferentes alternativas terapéuticas es la nanomedicina en enfermedades pulmonares (Yhee et al., 2016), ya que promete una mayor respuesta frente a los tratamientos convencionales al incrementar la concentración local de los fármacos requeridos, con una mejor eficiencia y seguridad (Guttenberg, 2016). Debido a que los pulmones poseen una gran superficie y contacto directo con el medio ambiente son la vía de entrada más importante de xenobióticos al organismo (Blank et al., 2017), lo que los convierte en un blanco accesible y no invasivo de liberación de fármacos.

Actualmente el tipo de nanopartículas utilizadas para tratar enfermedades pulmonares son las nanopartículas acarreadoras (nanoacarreadores) (Makled et al., 2017), que son de tipo lipídico (NLC por sus siglas en inglés) y se utilizan únicamente como un sistema de liberación de fármacos o moléculas específicas.

1.5.1. Nanoesferas transportadoras de DNA

El transporte de material genético fue uno de los primeros intentos en comenzar esta tecnología como una alternativa terapéutica. Fue entonces el interés en manipular los genes relacionados con la fibrosis quística, mediante nanoesferas que transportaban DNA a las células dañadas, que llevaron al uso de las nanopartículas en nanomedicina pulmonar. Este material contenía la información para detener el proceso fibrótico. Las nanoesferas se probaron en líneas celulares de tráquea (9HTEa), en las cuales pudieron observar una expresión del gen profibrótico en la mitad de la población celular empleada. (Bahadori et al., 2012).

1.5.2. Nanoacarreadores con blanco en el endotelio

En el año 2014 en la Universidad de Pensilvania en Estados Unidos (Brenner, et al., 2014), se desarrolló un tratamiento a base de nanopartículas que funcionaran como recubrimiento y que tuvieran como blanco farmacológico la vasculatura del pulmón, ya que ésta juega un rol importante en muchos desórdenes que afectan a este órgano, alterando la fisiología pulmonar, debido a que controla procesos como: permeabilidad para el transporte de lipoproteínas y nutrientes, flujo sanguíneo que lleva a la hemostasis, tono vascular, angiogénesis y la migración de leucocitos.

Con este estudio, se mostró en modelos animales que según las alteraciones del endotelio a corregir, usar diversos agentes como: corticoesteroides y antioxidantes donde el agente nanoacarreador fueron liposomas, trombomodulina, nanoesferas de copolímero de ácido láctico y glicólico (PGLA por sus siglas en inglés) y dendrímeros entre otros, la cantidad del fármaco liberado logró aumentar significativamente en el sitio deseado, logrando notorias mejorías en el proceso de la enfermedad, a diferencia de los resultados con tratamientos tradicionales.

1.5.3. Nanopartículas para transporte de prostaglandina E y siRNA

Actualmente (2017), en el grupo de trabajo de Garbuzenko, et al., (2017), se comenzó con el uso de nanopartículas acarreadoras (nanoacarreadores), con

fines terapéuticos para la fibrosis pulmonar en su forma idiopática. Estos acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC por sus siglas en inglés) se utilizan como un sistema de liberación para prostaglandina E (PGE2) en combinación con siRNA(s) selectivos.

Este sistema llega al pulmón por vía inhalatoria con la finalidad de inhibir los genes profibróticos de la enfermedad además de tener como blanco a la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF por sus siglas en inglés). Este tratamiento tiene la finalidad de evitar y/o limitar el avance y el daño causado por la FPI.

Con este estudio clínico se logró demostrar una alta eficacia de la liberación localizada de la PGE2 liposomal en el pulmón, consiguiendo limitar los signos del pulmón dañado. Por otro lado, los signos de limitación por fibrosis, inflamación, edema e hipoxia pudieron seguirse observando en los pulmones después del tratamiento.

1.5.4. Tendencias en nanomedicina pulmonar

Las perspectivas actuales en nanomedicina pulmonar son:

- 1) Mejorar la funcionalización en nanopartículas para retenerse en el pulmón al ser inhaladas
- 2) Dirigir la concentración adecuada al sitio deseado.
- 3) Mejorar la eficiencia en liberación de genes en las células blanco (Yhee, *et al.*, 2016)

Hasta la fecha, no se ha reportado algún estudio donde se usen nanopartículas con propiedades catalíticas con el fin de atacar alguna enfermedad pulmonar. Sin embargo, esta aplicación catalítica, con nanopartículas de cobre y platino, ya ha sido empleada en diferentes tipos de cáncer del sistema nervioso central desde el 2010 por el equipo de trabajo de la Dra. Tessy López con sus inicios en

el Instituto de Neurología y Neurocirugía, continuando con la investigación en la Universidad Autónoma Metropolitana.

Basado en la necesidad de ofrecer opciones diferentes para padecimientos de gran impacto social, el presente trabajo hace una primera aproximación al estudio y aplicación del material NPt modificado como una posible alternativa el tratamiento de la FPI mediante el estudio de la interacción célula – nanopartícula, permitiendo evaluar la viabilidad de un primer intento en el uso de la nanomedicina aplicada a las enfermedades fibróticas pulmonares.

2. HIPÓTESIS

Las nanopartículas Pt(acac)₂/TiO₂-F (NPt), tendrán el tamaño y propiedades fisicoquímicas adecuadas para tener actividad citotóxica sobre las células que desarrollan la Fibrosis Pulmonar Idiopática.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Desarrollar nanopartículas de Pt(acac)₂/TiO₂-F como un sistema nanobiocatalítico viable para su uso en fibrosis pulmonar idiopática.

3.2. Objetivos Particulares

- I. Desarrollar la metodología experimental para la síntesis de las nanopartículas de Pt(acac)₂/TiO₂-F con un tamaño de partícula entre 5 y 20 nm.
- II. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los nanobiocatalizadores Pt(acac)₂/TiO₂-F.
- III. Cuantificar la viabilidad celular ante la exposición a los nanobiocatalizadores mediante el ensayo MTT.

4. METODOLOGÍA

La síntesis de las nanopartículas NPt en este trabajo, se basó en la metodología empleada por López, T., et al (2011). En esta tesis se realizó una modificación al material con la finalidad de conferir diferentes propiedades al mismo para su uso en fibrosis pulmonar idiopática.

4.1. Síntesis NPt-fibrosis

Las nanopartículas NPt-fibrosis (R, RP3, RP9, Ca, P3 y P9), compuestas principalmente de TiO₂ y platino, fueron sintetizadas por el método sol-gel siguiendo el protocolo descrito en López, T., et al (2011). Como precursores se usaron: tetrabutóxido de titanio (IV) (Ti(OCH₂CH₂CH₂CH₃)₄), Ti(OBu)₄, Sigma-Aldrich, 97%) y acetilacetato de platino (II) (Pt(C₅H₇O₂)₂, Pt(acac)₂, Sigma-

Aldrich, 97%). El ácido γ -aminobutírico ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$, GABA, Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$) se utilizó como agente funcionalizante para el material.

Brevemente, en un matraz de tres bocas y fondo redondo, se preparó una solución acuosa de GABA al 5% en peso (fase acuosa) respecto a la masa total de la muestra. El $\text{Pt}(\text{acac})_2$ se disolvió por separado en acetilacetona ($\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3$, acac, Sigma-Aldrich) (fase orgánica), y se agregó a la fase acuosa bajo agitación rigurosa. Para modificar el material, se añadieron 0.15 y 0.45 ml de peróxido al 30%, para los materiales P_3 y P_9 respectivamente. El tetrabutóxido de titanio (IV) se añadió gota a gota y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 48h. Se usó una relación molar del 1% en platino respecto al alcóxido. El sobrenadante fue decantado y la muestra sólida se secó a 60°C por 48h hasta obtener un polvo de color amarillo. Éste último se pulverizó y almacenó a condiciones ambientales para ser posteriormente caracterizado.

La síntesis de los materiales se encuentra esquematizada en la Figura 4.

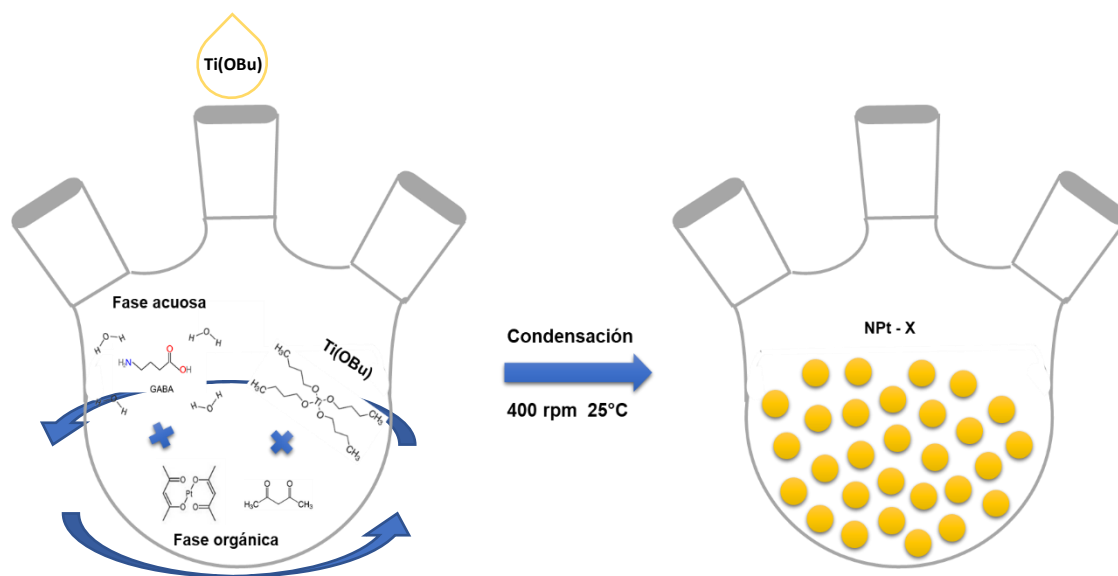


Figura 4. Esquema de la síntesis de las nanopartículas NPt-fibrosis.

Como productos de la síntesis, se obtuvieron 6 muestras divididas en 2 grupos:

1) Material sin platino: 3 referencias

a) R: contiene $\text{Ti}(\text{OBu})_4 + \text{acac} + \text{GABA} = \mathbf{A}$

b) RP₃: contiene **A** + peróxido (H₂O₂)

c) RP₉: contiene **A** + peróxido en proporción 1:3 respecto a RP₃

2) Material con platino: 3 materiales

a) Ca: Ti(OBu)₄ + acac + Pt(acac)₂ + GABA = **B**

b) P₃: contiene **B** + peróxido (H₂O₂)

c) P₉: contiene **B** + peróxido en proporción 1:3 respecto a P₃

Las muestras sin Platino se sintetizaron con la finalidad de tener una referencia con la cual se pudiera compararse algún efecto que sea favorecido por la presencia de este metal o si el efecto es propio del material en sin el metal.

4.2. Caracterización Fisicoquímica

Para estudiar las propiedades fisicoquímicas de los materiales sintetizados, éstos se analizaron mediante técnicas de caracterización complementarias que permiten describir su tamaño, forma, estados de oxidación, cristalinidad y composición química con la finalidad de describir su estructura y características funcionales. En esta sección se presentan las técnicas, su instrumentación y metodología de preparación de muestras.

4.2.1. Microscopía Electrónica Barrido (SEM)

El estudio de la morfología superficial de las nanoestructuras se realizó mediante SEM. Esta técnica realiza un barrido completo de la muestra, generando así, una imagen de la morfología de su superficie. Para ello, utiliza un haz de electrones aproximado de 20kV que permite alcanzar una resolución aproximada de 10 nm, pudiendo determinar detalles de superficie a pequeñas escalas.

Las muestras fueron montadas en seco, sobre cilindros de aluminio usando cinta doble cara de cobre (Electron Microscopy Science), y recubiertas con una delgada capa de oro. La técnica se trabajó en colaboración con la M. en C. Pilar

Ramos y el Dr. Diego Oliva Rico de la Unidad de Microscopía del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). Se utilizó un microscopio AURIGA marca ZEISS operado a 3 kV y equipado con un detector de electrones secundarios (SE).

La composición química de las muestras se determinó por Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS). Mediante el análisis de la energía de los rayos X característicos producidos por la muestra se identificaron los elementos presentes en ella. Los polvos se dispersaron en seco sobre cinta de carbón adherente para su análisis. El estudio se realizó en colaboración con el Dr. José Reyes Gasga y el Ing. Químico Samuel Tehucanero del Instituto de Física de la UNAM, se usó un microscopio JEOL 7800F operado a 15 kV y equipado con un detector acoplado para rayos X.

4.2.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El estudio de la morfología, tamaño y cristalinidad de los materiales se realizó mediante la técnica TEM. Esta técnica permite obtener imágenes que proporcionan información detallada sobre la estructura interna de los materiales, ya que se alcanza una resolución de hasta 2 nm. Para ello, la muestra es atravesada con un haz de electrones de alta energía (100 - 200 kV), ventaja importante respecto a SEM, la cual, nos permite ver únicamente su estructura superficial.

Las muestras fueron pulverizadas en un mortero de ágata y depositadas sobre rejillas de cobre recubiertas con formvar (200 mesh, Electron Microscopy Sciences) siguiendo una técnica desarrollada en el IF-UNAM. Las rejillas fueron analizadas con ayuda del Ing. Químico Samuel Tehuacanero en un equipo JEM-2010F FASTEM, operando a 200 kV.

A manera de obtener información cualitativa sobre la homogeneidad química y abundancia de un elemento, se empleó la técnica de Campo Oscuro Anular de Alto Ángulo (HAADF), también llamada contraste-Z. En esta técnica, las áreas más brillantes (densas) indican la presencia de elementos pesados, de mayor

número atómico, mientras que las áreas más opacas (translúcidas) caracterizan a los elementos más ligeros.

4.2.3. Difracción de Rayos X (XRD)

Para conocer la identidad y estructura de un compuesto, se realizó la caracterización mediante difracción de rayos X. Esta técnica permite identificar las fases cristalinas presentes en los materiales mediante reflexiones en un difractograma. Las reflexiones son generadas por la difracción producida por el haz de fotones de rayos X al incidir sobre la muestra.

El análisis de los polvos sin tratamiento térmico se realizó sobre un portamuestras de aluminio con una depresión circular en el centro, el cual fue cubierto por completo. La técnica se desarrolló en colaboración con Dr. Rodrigo Velázquez Castillo del Laboratorio de Difracción de Rayos X de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) en un difractómetro D8 Advance marca Bruker. El equipo operó con una lámpara de cobre (1.5406 \AA $\text{CuK}\alpha$) a 35 kV y 15 mA. La medición fue realizada de 90° a 5° en escala 2θ con tamaño de salto de 0.02° .

4.2.4. Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR)

Con la finalidad de identificar algunas moléculas de interés en el material, se realizó el análisis mediante la técnica de espectroscopía infrarroja. Esta técnica permite conocer los diferentes grupos funcionales presentes en los materiales sintetizados. La identificación se realiza al hacer incidir un haz de luz en la región infrarroja del espectro electromagnético (4000 a 400 cm^{-1}) a la muestra, produciendo la vibración ciertos grupos en las moléculas.

El análisis con la técnica de ATR se realizó en un equipo FTIR Affinity-1 (Shimadzu) del Laboratorio de Nanotecnología y Nanomedicina en la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco para caracterizar los materiales mediante las técnicas de Reflexión Total Atenuada (ATR por sus siglas en inglés) y de transmisión con KBr.

Para la técnica de transmisión, se prepararon pastillas de 100 mg en una proporción 5 – 95% analito – KBr. El KBr es un material ópticamente transparente en el rango espectral del infrarrojo. Por su característica higroscópica y posible interferencia con grupos -OH en los espectros, el KBr fue secado durante 30 minutos a 100°C antes de su uso. Las cantidades pesadas fueron mezcladas en un mortero de ágata y posteriormente prensadas. El análisis se realizó en un rango de 400 a 4000 cm^{-1} obteniendo un espectro resultante del promedio de 60 mediciones. Muestras control para el precursor de platino ($\text{Pt}(\text{acac})_2$) y GABA también fueron analizadas con la finalidad de detectar grupos funcionales propios de estos reactivos y hacer su comparativo con el material.

Para la técnica ATR, el módulo específico fue instalado en el equipo y se depositó una pequeña cantidad de polvo en el cristal ATR de alto índice de refracción que transmite la luz. El análisis fue efectuado entre 4000 y 600 cm^{-1} obteniendo un espectro promedio de 60 análisis.

4.2.5. Espectroscopía Ultravioleta – Visible (UV-vis)

Para adquirir información sobre el entorno de las especies químicas presentes en el material se empleó espectroscopía ultravioleta-visible por reflectancia difusa en sólido (DRS). Esta técnica determina los estados transicionales de los átomos en el material, en energías dentro de la región UV-Vis. La señal es generada por el cambio en la cantidad de luz que es reflectada fuera de la muestra.

Los polvos se montaron en una superficie de cuarzo (transparente a la región espectral del UV) para su análisis. Las mediciones fueron realizadas por la Dra. Verónica de la Luz Tlapaya en el Laboratorio de Catálisis de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa y en colaboración con el Dr. Ricardo Gómez en un espectrofotómetro Cary 300 versión 9.0. Para el análisis se realizó un barrido de 200 a 800 nm con una velocidad de barrido 600.00 (nm/min) y un intervalo de datos de 1.000 nm.

4.2.6. Espectroscopía de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS)

Para determinar la composición química y estado de oxidación de los elementos presentes en las muestras, se utilizó XPS. Esta técnica de superficie permite analizar las primeras capas atómicas del espécimen llegando a una profundidad de hasta 10 nm. El espectro general corresponde al análisis elemental semicuantitativo de la muestra y proporciona valiosa información sobre su pureza. Los espectros XPS de alta resolución, obtenidos para energías de enlace específicas, concluyen en el estado de oxidación de cada elemento y en su configuración química. A partir de éstos últimos, se puede estimar la estequiometría de los materiales.

Los polvos se depositaron directamente sobre cinta de cobre adherida a un soporte de Inox. Se midieron 6 muestras y 2 dos controles, éstos últimos corresponden al GABA y Pt(acac)₂ nativos. Las mediciones se realizaron en colaboración con el Dr. José Luis Rodríguez López del Departamento de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN), con un espectrómetro PHI 5000 VersaProbe II equipado con una fuente de rayos-X Al-K α monocromática (1486.7eV) a un voltaje de 15kV.

4.2.7. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Para observar la estabilidad y comportamiento de los materiales en relación a la temperatura, se analizaron por termogravimetría. En esta técnica, el material pierde masa conforme la temperatura incrementa y es registrado mediante curvas. Según los componentes del material, será la forma final de la curva obtenida.

Se pesaron aproximadamente 10 mg de cada muestra en charolas de platino. El estudio se llevó a cabo en un equipo TGA-Q500 thermobalance TA Instruments en la Universidad Autónoma de Querétaro. Las muestras fueron analizadas de temperatura ambiente (25°C) hasta 800°C con una tasa de incremento de 10 °C/min y bajo flujo de nitrógeno (60 mL/min).

4.2.8. Fisisorción de Nitrógeno (BET)

Las propiedades texturales de los materiales, fueron determinadas a través de las isothermas de adsorción de nitrógeno (N₂) a 77 °K en un equipo fabricado por investigadores del Laboratorio de Catálisis de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa. Las muestras fueron previamente desgasificadas a 423°K por 24 horas bajo una presión de vacío (10⁻⁴ mbar) para asegurar la limpieza de la superficie.

El área superficial de la muestra fue calculada de acuerdo a la ecuación B.E.T. (Braunauer-Emmet-Teller) con los datos obtenidos de la adsorción de nitrógeno a un intervalo de presión relativa de $0.03 < P/P_0 < 0.3$.

Para el análisis de la muestra, se pesaron 100 mg de muestra en una celda capilar de vidrio vacía. Se desgasificó a 80°C manteniendo la muestra a alta temperatura entre 10-12 horas. Posteriormente, el vacío se rompe con Helio, se pesan las muestras y se colocan en el puerto de análisis. El análisis fue realizado en el Laboratorio de Catálisis de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa por la Dra. Socorro Oros Ruiz.

4.3. Caracterización biológica

Con la finalidad de estudiar la interacción célula – nanopartícula en fibroblastos, se realizaron diferentes técnicas de caracterización que evalúan concentración óptima tóxica, citotoxicidad in vitro del materia y localización de las nanopartículas respecto a la célula.

4.3.1. Modelos celulares

Cultivos primarios de fibroblastos sanos y patológicos fueron utilizados para caracterizar la toxicidad y localización intracelular de los materiales sintetizados.

Los fibroblastos sanos, propios de un pulmón humano en condiciones normales, son identificados como FN4. Los fibroblastos patológicos, células responsables de la producción excesiva de colágena en la FPI, son nombrados HIPF-305.

Los cultivos primarios y ensayos de citotoxicidad se realizaron en colaboración con la Dra. Carina Becerril, investigadora en el área de FPI, en el laboratorio de bioseguridad nivel 2 del Laboratorio de Biología Celular del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Las células fueron obtenidas a partir de biopsias de pacientes humanos como se describe en Becerril et al. (1999).

4.3.2. Condiciones del cultivo celular

Los fibroblastos se cultivaron como células adherentes en monocapa. Se utilizó el medio de cultivo HAM F-12 (GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.) suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.), 10,000 U/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina y 25 mg/ml de anfotericina B. Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%. (Referencias de Cari 2,7)

Cuando el número de células en los frascos cubrió aproximadamente el 80% de la superficie (confluencia), las células fueron divididas y sembradas en nuevos frascos de cultivo (pase celular o subcultivo), como se muestra en la Figura 5, con ayuda de la enzima tripsina, la cual rompe los enlaces entre las células y el fondo de la caja. Para eliminar los restos de la enzima que pueden ser nocivos, las células fueron centrifugadas 10 minutos a 1820 rpm, resuspendidas y sembradas para continuar su cultivo.

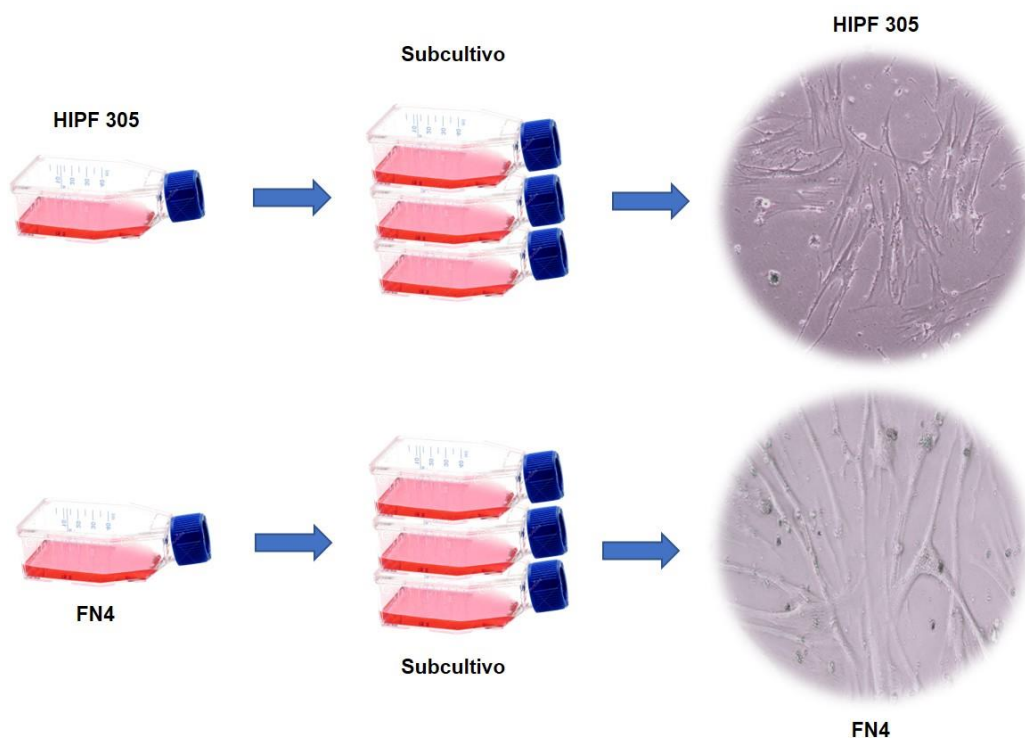


Figura 5. Subcultivo celular FN4 y HIPF 305.

4.3.3. Ensayo de citotoxicidad (MTT)

La citotoxicidad de los materiales, a diferentes concentraciones y tiempos de incubación, se evaluó a través de ensayos MTT (acrónimo para la sal empleada de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Brevemente, mediante la reducción a su sal (formazán) y seguida de una reacción colorimétrica, se establece una relación intensidad del color – viabilidad (actividad metabólica), la cual se cuantifica por espectrofotometría. El principio de la técnica se describe a detalle en el apartado siguiente.

4.3.3.1. Fundamento

La técnica MTT se basa en la reducción metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, MTT de color amarillo, a su sal (E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-1,3-difenilformazán, formazán de color azul en forma de cristales (Martínez-Torres et al., 2016) mediante la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. El mecanismo consiste en la transferencia de H⁺, del NADH/H⁺ a la sal de tetrazolio, reduciéndola y estableciendo así una relación colorimétrica con las células metabólicamente activas o viables (Präbst et al., 2017). A mayor número de células viables, mayor producción de cristales de formazán, los cuales al disolverse dan lugar a una coloración más intensa (Sylvester, 2011). La Figura 6 muestra el mecanismo de reducción del MTT a formazán.

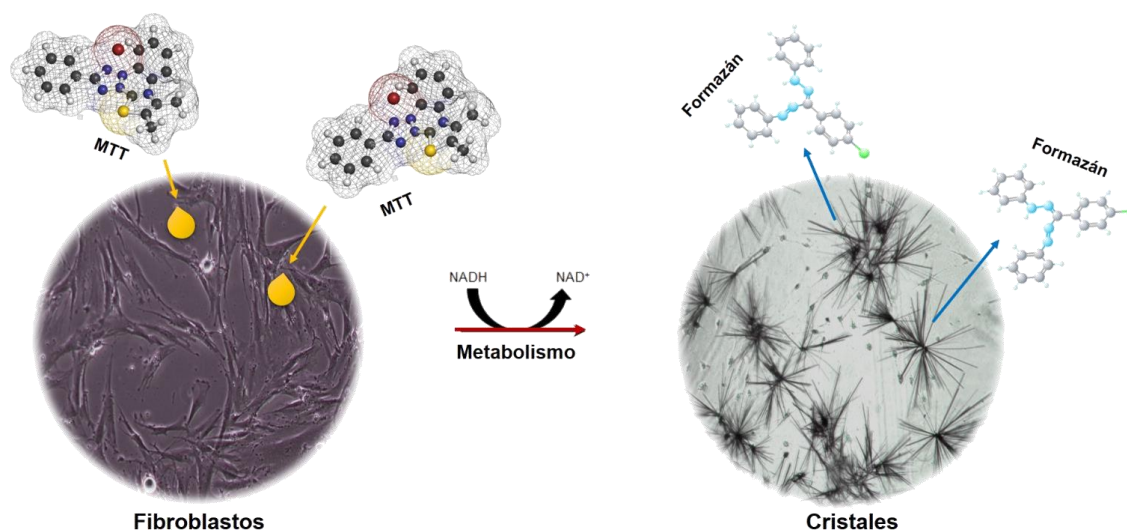


Figura 6. Muestra la conversión de MTT a formazán mediante su reducción por NADH.

4.3.3.2. Preparación de muestras

Se sembraron 8×10^4 células en placas de 96 pozos y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ toda la noche para permitir su adherencia. Posteriormente, los fibroblastos, tanto sanos como patológicos, fueron expuestos a diferentes concentraciones de las nanopartículas NPt Ca, P3 y P9 por 30 minutos, 4 y 24 horas, esto, con la finalidad de establecer la relación dosis - tiempo de exposición más efectiva.

Se prepararon diluciones del material en medio completo a razón de 40, 80, 120 y 160 µg/ml partiendo de una solución stock de 1000 µg/ml. Además, fueron preparados controles que consisten únicamente de medio completo sin material.

El sobrenadante de la siembra fue descartado y se añadieron 100 μl de las suspensiones a cada pozo como se muestra en la Figura 7. Al finalizar el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados con medio sin suero y se añadió el reactivo MTT (Cell Proliferation Kit I Sigma-Aldrich) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Una vez formados los cristales de formazán (azules al microscopio), se les añadió 100 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) con la finalidad de solubilizarlos. Se dejó actuar 30 minutos y posteriormente se procedió a su lectura.

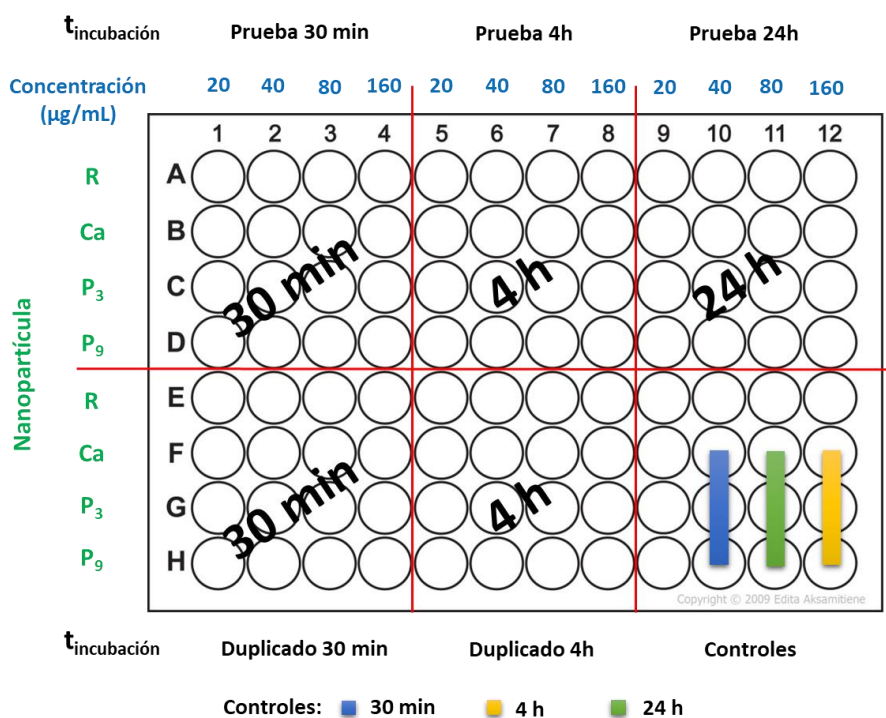


Figura 7. Planeación experimental del ensayo de citotoxicidad con MTT.

La lectura espectrométrica de las placas se realizó en un equipo Sinergy HT (BioTek) mediante el software Gen5 a 595 nm. Para los controles se tomaron los valores de los pozos sin tratamiento y con ellos se normalizaron los datos para el análisis estadístico. El ensayo se realizó completando triplicados para cada condición de tiempo y concentración.

4.3.4. Localización intracelular de nanopartículas

Para estudiar posibles mecanismos y rutas de internalización de nanopartículas, así como sitios de alojamiento de las mismas en células del tejido pulmonar, se

realizó su estudio con diferentes técnicas de microscopía. Éstas abarcan la identificación morfológica y localización del material en la célula (SEM y TEM) y su dinámica en tiempo real mediante del marcaje fluorescente de nanopartículas (Fluorescencia y Time Lapse).

4.3.4.1. Fijación de células

La localización intracelular de las nanopartículas se estudió en células fijas. Para esto, se usó paraformaldehído al 4% en PBS y glutaraldehído al 2.5%, moléculas que se unen a través de su grupo aldehído con los grupos aminos de los componentes celulares, y tetraóxido de osmio que se une a los fosfolípidos de membrana, como se muestra en la Figura 8, lo que permite preservar el sitio de origen y estructura. Además, forman enlaces con enzimas evitando la degradación de la muestra.

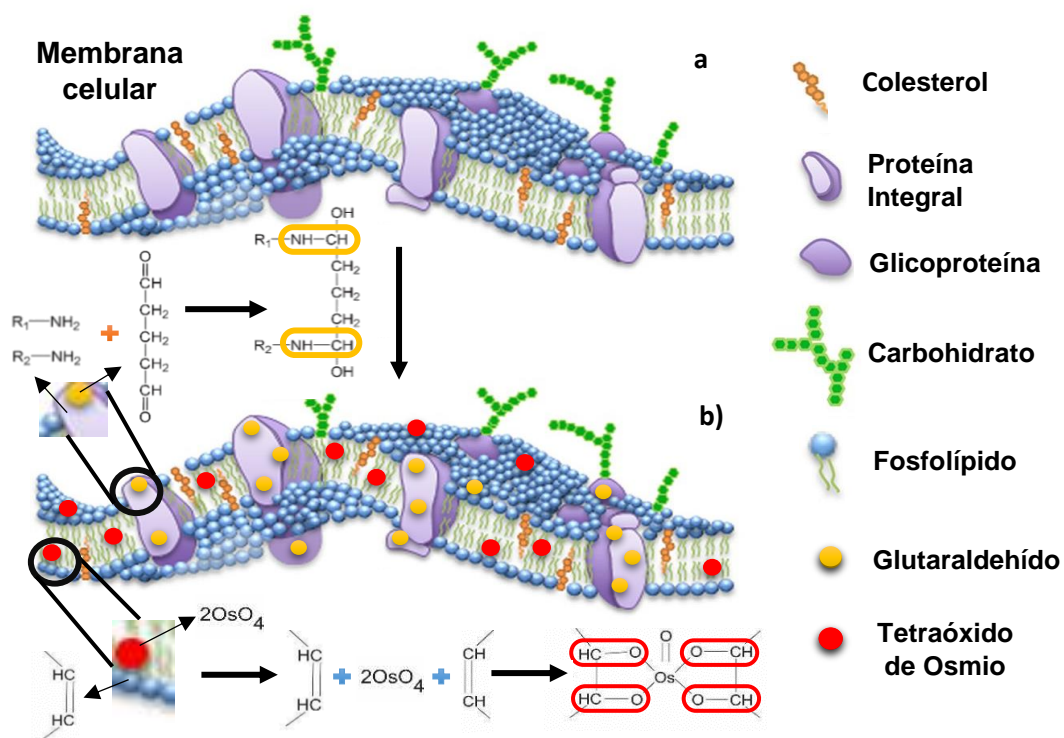


Figura 8. Mecanismo de acción del glutaraldehído y tetraóxido de Osmio sobre la membrana celular de los fibroblastos en el proceso de fijación. a) Membrana celular sin tratamiento. b) Unión de los agentes de fijación a los componentes de la membrana celular.

Se compararon los resultados por parte en placas de 9 pozos. Se usó células control y 4 con células + 40 µg/mL de material P₃ y P₉, como se muestra en la Figura 9, para un periodo de 30 minutos y 4 horas.

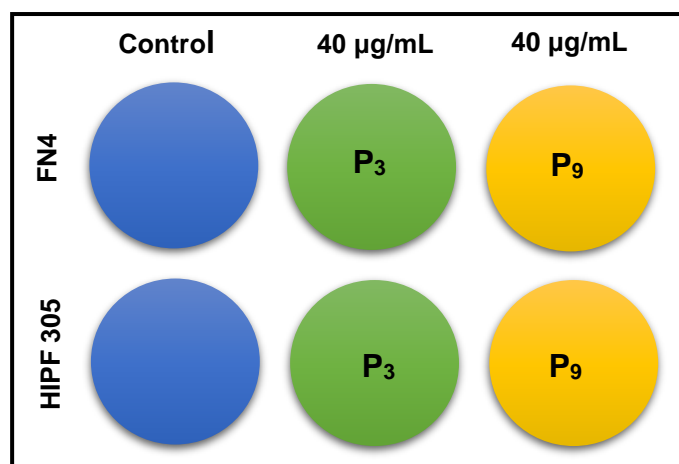


Figura 9. Planeación para la fijación de células post exposición a las nanopartículas P3 y P9.

4.3.4.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Con la finalidad de observar posibles interacciones célula-nanopartícula a nivel membranal, se recurrió a SEM. Esta técnica permite observar nanopartículas debido a su resolución, pudiendo identificar aglomerados de éstas sobre las células por su capacidad de realizar un barrido completo de la superficie por su haz de electrones.

Para observar diferentes estructuras celulares, fue necesario usar fijadores que dieran contraste por su masa molecular a organelos de interés, como el tetraóxido de osmio que se une a los dobles enlaces de los ácidos grasos presentes en la membrana celular para evitar perder su estructura. Finalmente, fueron secadas a punto crítico, método por el cual la muestra biológica se seca sin perder su estructura, y recubiertas con oro para hacer la muestra conductora, ya que las muestras biológicas por sí mismas no facilitan el recorrido de los electrones por su superficie.

La preparación de las muestras se realizó en colaboración con la M. en C. María del Pilar Ramos del INCAN. La obtención de imágenes se realizó en la unidad de microscopía del INCAN en colaboración con el Dr. Diego Oliva, en un microscopio AURIGA marca ZEISS, operado a 3 kV, empleando electrones secundarios (SE).

4.3.4.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Para complementar el estudio de la dinámica célula - nanopartícula, la técnica TEM permitirá identificar la localización intracelular, ya que se efectúan cortes del orden de nanómetros. En los fibroblastos, será posible observar tamaño, distribución y localización del material en citoplasma y organelos contrastados tales como mitocondria, retículos, etc., contribuyendo a definir los sitios probables de alojamiento.

Para poder observar muestras biológicas en TEM, es necesario realizar cortes muy delgadas de tejido (aprox., 150 nm), por lo que éste debe endurecer mediante resina tipo epoxy, la cual entra al tejido como un líquido y va polimerizando sin afectar la estructura de la célula. Al no ser hidrosoluble, se debe sustituir el agua con solventes orgánicos compatibles con la resina.

Finalmente, los cortes se colocaron en una rejilla de cobre y se pasaron por una solución de plomo de Reynolds como medio de contraste para ser lavados con abundante agua y visualizados en el microscopio.

La obtención de imágenes fue llevada a cabo en colaboración con la M. en C. María del Pilar Ramos del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) en un equipo JEOL 1010 operado a 60kV.

4.3.4.4. Microscopía de Fluorescencia

Como un auxiliar en el estudio de la dinámica de las nanopartículas en su interacción célula – material, se realizó el marcaje con el fluorocromo isocianato de Rodamina B (RhB-ITC) como se muestra en la Figura 10. Al unir este compuesto al material, se puede seguir con claridad el recorrido de las nanopartículas (aglomerados) en el medio de interacción, ya que al excitar la molécula a 545 nm se produce fluorescencia de color rojizo, que nos permite observar la trayectoria que sigue el material en su dinámica con las células, logrando establecer posibles mecanismos de internalización y alojamiento intracelular dado el caso.

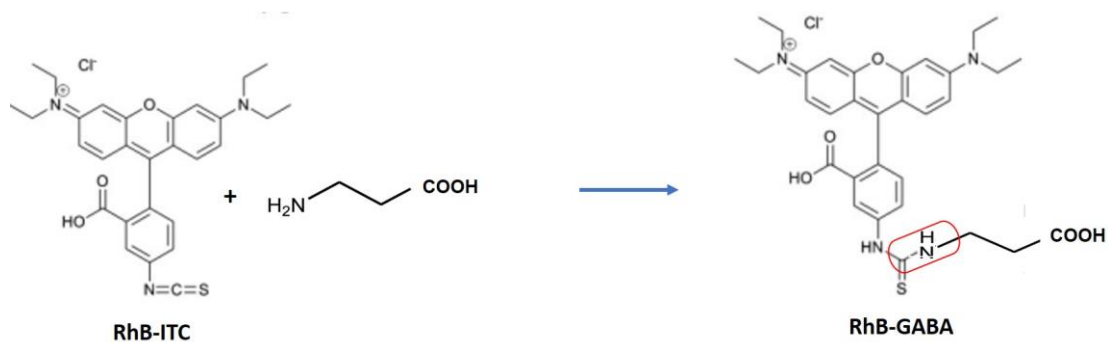


Figura 10. Marcaje de Nanopartículas con RhB – ITC a través del grupo amino del GABA

4.3.4.4.1. Time Lapse

Con la finalidad de observar los mecanismos de interacción nanopartícula-célula, principalmente la internalización celular, se realizó la toma de capturas fotográficas in vivo de los fibroblastos expuestos al material en un periodo determinado, obteniendo imágenes secuenciales que finalmente se reproducen como una animación cronológica del suceso.

Para esta técnica se sembraron 4×10^4 células en placa de 2 pozos, las cuales fueron expuestas a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ de nanopartículas marcadas con RhB-ITC, para posteriormente filmar desde el inicio de la interacción nanopartícula-célula. Los registros se obtuvieron en intervalos de 10 minutos durante 24h. La grabación se realizó en colaboración con el Dr. Alejandro López Saavedra de la unidad de Microscopía del INCAN en un equipo AxioVert 200M marca Zeiss.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En esta sección se presenta la caracterización y evaluación biológica de las nanopartículas NPt modificadas. La caracterización fisicoquímica se describe en la sección 4.1. La caracterización biológica y su evaluación en cultivos primarios de fibroblastos pulmonares se describe en la sección 4.2.

5.1. Caracterización Fisicoquímica

5.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En la Figura 11 se muestran las micrografías obtenidas por SEM de los polvos de los materiales NPt- P₃ y P₉, donde se observan aglomerados.

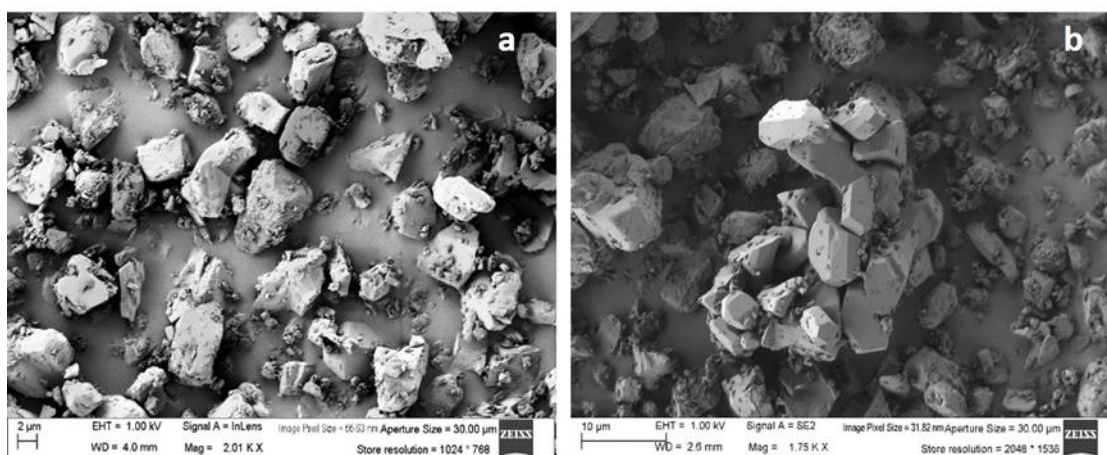


Figura 11. Micrografías SEM de a) NPt-P₃ y b) NPt-P₉.

La Figura 11 a) y b), muestra aglomerados de diferentes tamaños, para las partículas P₃ y P₉ respectivamente, los cuales se componen de estructuras que van desde el rango de los nanómetros hasta las micras. Se observan algunas formaciones con tendencia hexagonales, pero no puede definirse claramente algún patrón o característica específica para su morfología. Por ello, es necesario complementar su análisis con la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión que proporcionará más información sobre estas características.

Con la finalidad de determinar la composición elemental de las muestras, se realizó un análisis mediante la técnica de EDS, del cual se obtuvo el espectro mostrado en la Figura 12, donde observa la composición química del material basado en 3 elementos de interés: Ti y O principalmente y algunos indicios de la presencia de Pt.

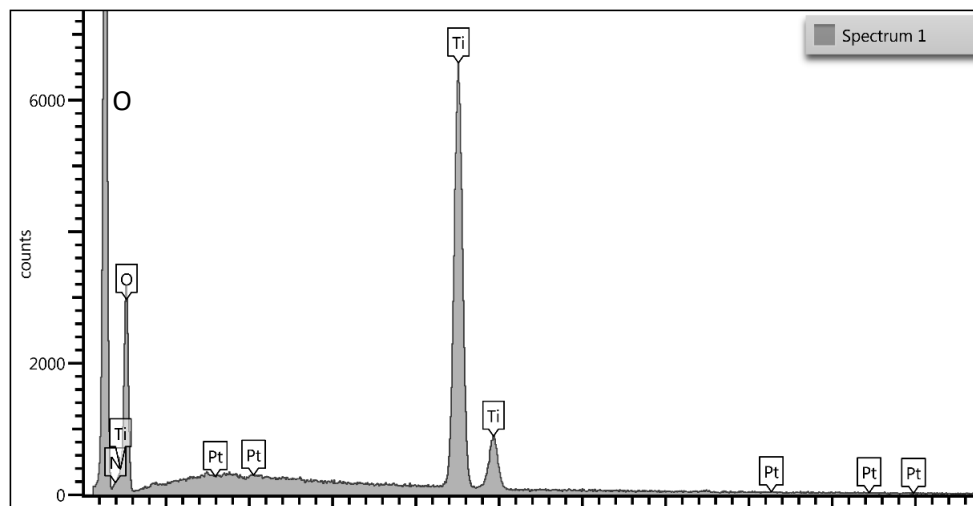


Figura 12. Análisis EDS del material NPt-P₃.

En la Figura 12, se observan señales de los elementos O y Ti principalmente. El análisis sugiere la presencia de Pt en la muestra, lo cual será complementado/confirmado con XPS. Estos elementos conforman parte de la estructura del material NPt P3. Se aprecian diferentes intensidades en las bandas, lo que se correlacionan directamente con la cantidad que existe de cada elemento en la muestra. Los porcentajes de cada elemento se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de elementos presentes en la muestra P3

<i>Elemento</i>	Line Type	Concentración Aparente	k Ratio	Wt%
<i>O</i>	K series	2.32	0.00781	58.59
<i>Ti</i>	K series	3.67	0.03668	40.99
<i>Pt</i>	M series	0.03	0.00034	0.42
Total:				100.00

En la tabla 1, se observa como mayor componente al oxígeno en la estructura del material, seguido del titanio, lo cual tiene congruencia debido a la capacidad coordinativa del titanio. Por otro lado, la cantidad de Platino es muy baja en comparación con los otros elementos, lo cual se relaciona con el proceso de síntesis como se describe en la sección 1 del apartado de Metodología.

5.1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La Figura 13 muestra las micrografías TEM y HRTEM de 3 materiales, Ca, P₃, y P₉, a diferentes magnificaciones.

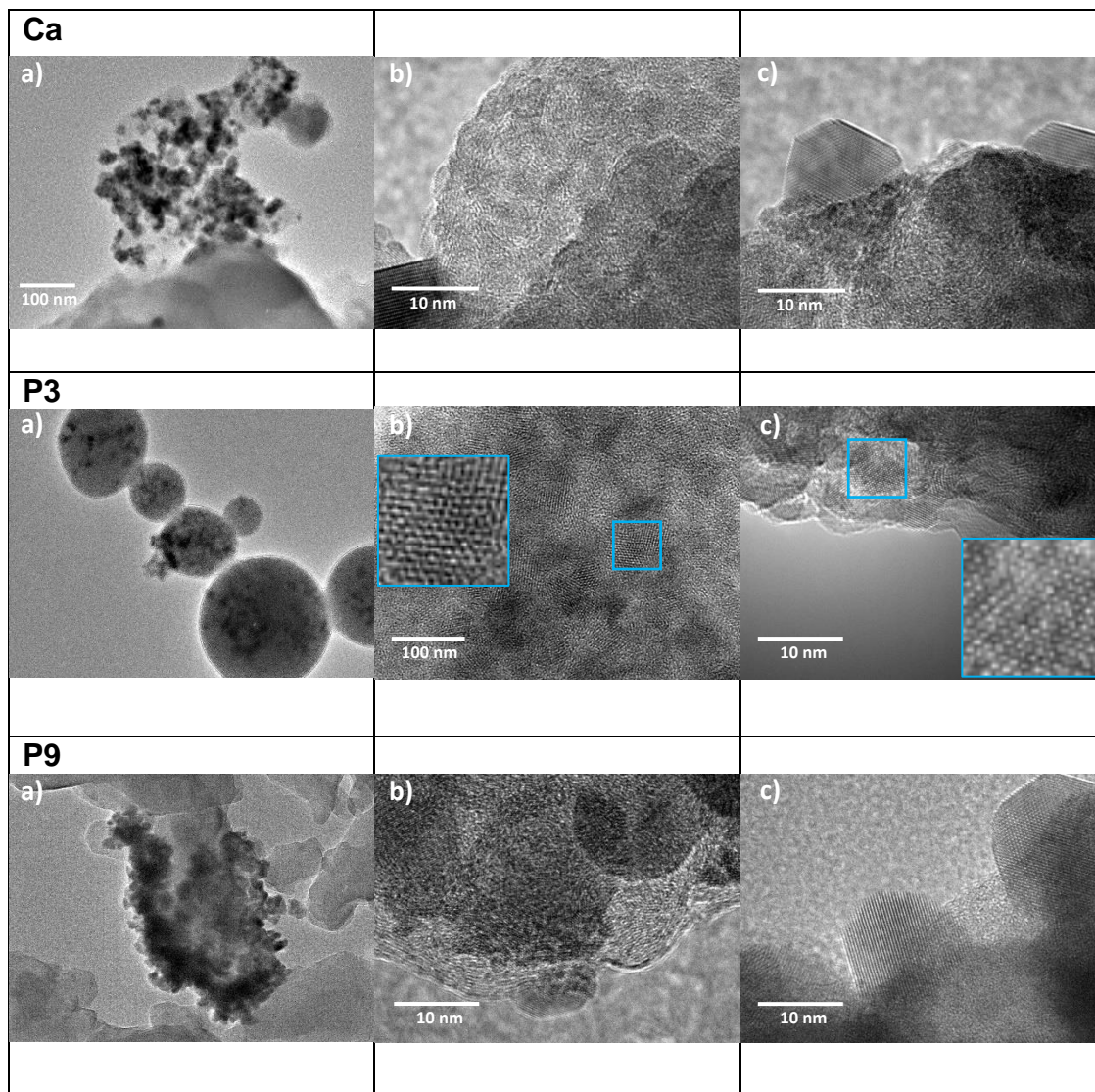


Figura 13. Micrografías TEM y HRTEM de los materiales Ca, P₃ y P₉.

En la Figura 13 se muestran micrografías de los materiales Ca, P₃ y P₉ a diferentes magnificaciones donde se observan zonas con aglomerados y algunos arreglos cristalinos. En a) de los materiales Ca y P₉, se aprecian aglomerados sin orden aparente y apariencia amorfa; mientras que para el material P₃, se observa una preferencia a agruparse de forma esférica. En c), a mayores magnificaciones con la técnica HRTEM, se evidencia la presencia de estructuras cristalinas en los 3 materiales, donde se aprecia un tamaño entre 3 y 15 nm y morfología de aspecto hexagonal.

Las características mostradas por las técnicas TEM y HRTEM concuerdan con lo reportado por López *et al.* (2011) para el material NPt – Ca.

Por otro lado, las agrupaciones esféricas (P₃), se pueden correlacionar con la modificación realizada en el proceso de síntesis dando indicios de la obtención de nuevos materiales.

Para complementar la evaluación en sistemas biológicos (ver apartado de metodología sección 3), se realizó un estudio del material en condiciones similares a las que se encontraría en la célula con la finalidad de conocer este comportamiento. Una cantidad de nanopartículas fue agregada a unos mililitros de medio de cultivo y se dejó en solución por aproximadamente 4h. Para analizar el efecto de las interacciones medio-material. Se realizaron micrografías TEM y HRTEM como se muestra en la Figura 14.

En la Figura 14 se puede observar nanopartículas bien distribuidas de tamaños menores a los 100 nm y sin agregados notables. Esta distribución puede asemejarse al comportamiento dentro de un sistema biológico, ya que en éste, existen biomoléculas proteicas que se adhieren a nanopartículas dependiendo de las características de su superficie formando una biocorona (Wolfram *et al.*, 2014). La inclusión de estas moléculas pudiera alterar parámetros fisicoquímicos como la carga, generando repulsión entre las nanopartículas, favoreciendo su separación y generando diferentes tamaños. Al realizar el análisis mediante la técnica de HRTEM se observan partículas entre 5 y 35 nm aproximadamente, formadas por cristales de tamaños que oscilan entre 5 y 15 nanómetros.

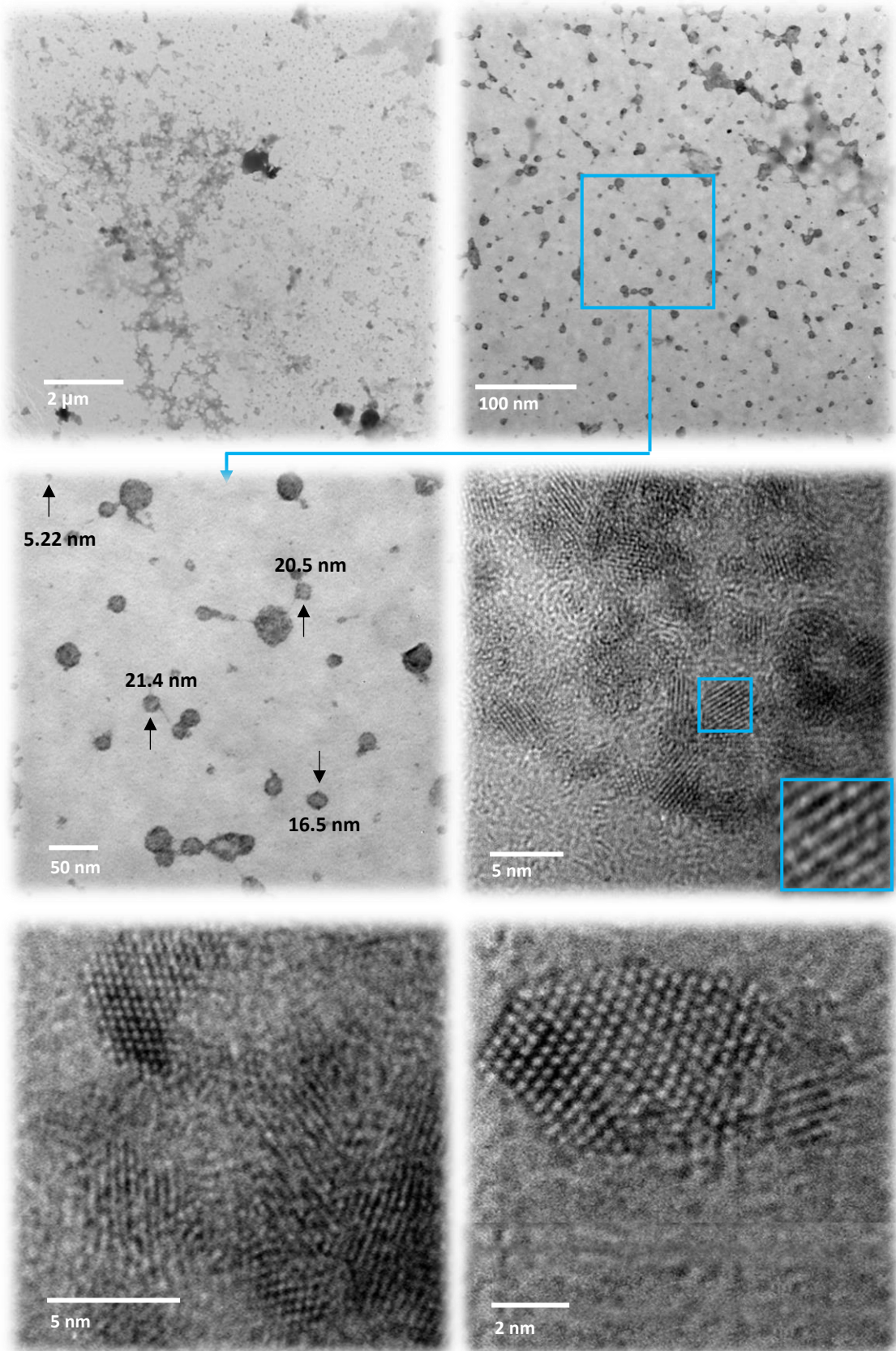


Figura 14. Micrografías TEM de nanopartículas en solución con medio de cultivo.

5.1.3. Difracción de Rayos X (XRD)

En la Figura 15 se muestran los difractogramas de los polvos a) Ca, P₃ y P₉ y b) R, RP₃ y RP₉.

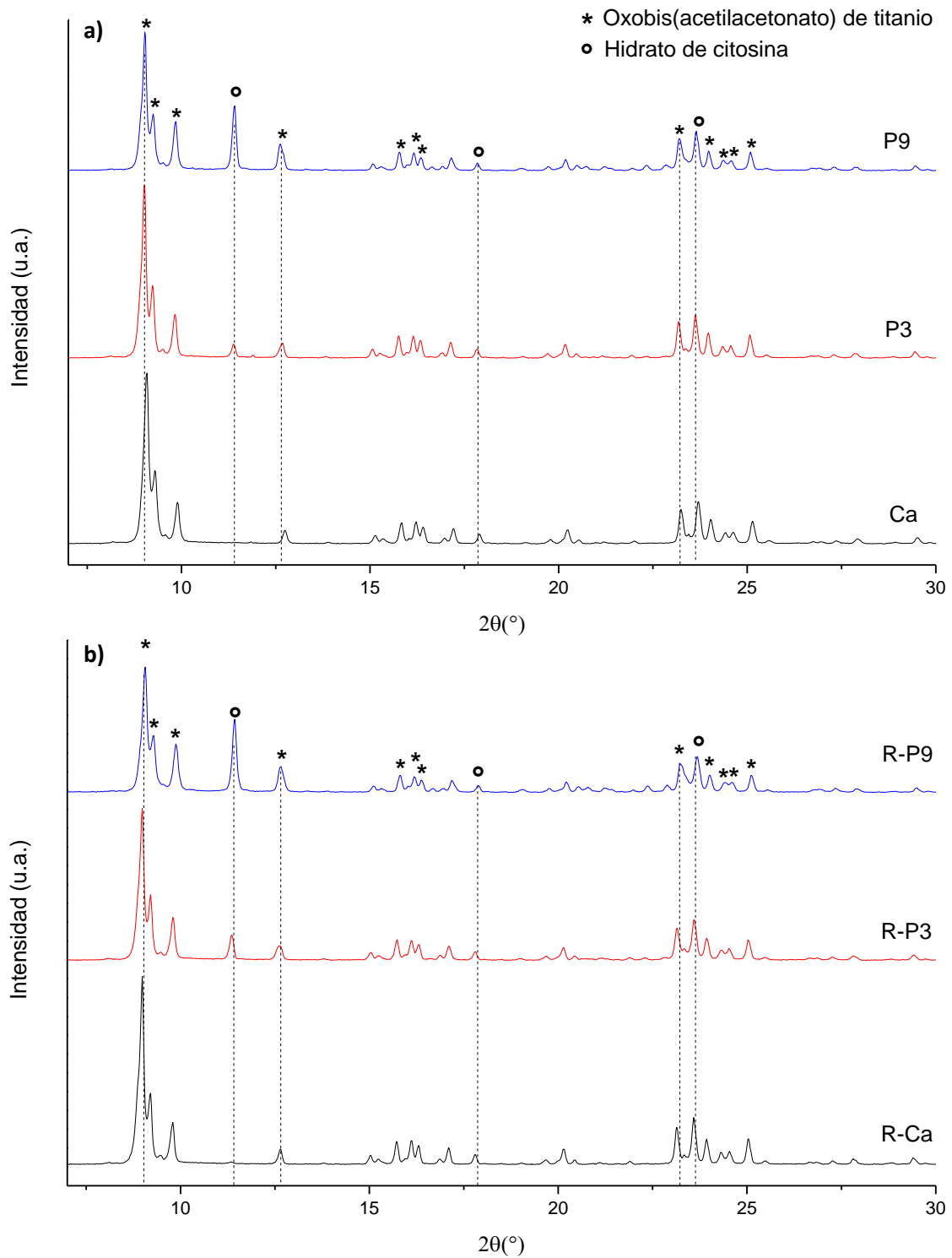


Figura 15. Difractogramas comparativos de los nanocristales. a) Muestras Ca, P₃ y P₉. b) Muestras R-Ca, RP₃ y RP₉.

La Figura 15 muestra reflexiones correspondientes a los diferentes cristales presentes en el material. Los materiales se agrupan según la presencia (a) o ausencia (b) de platino durante la síntesis, donde se realizó la identificación de las fases cristalinas por comparación con los archivos de difracción de polvos (PDF), de los cuales se puede asignar: a) oxo bis acetilacetato (PDF 35-1778) y b) hidrato de citosina (PDF 09-0723). Para el oxo bis acetilacetato, la reflexión más intensa está a 8.94° en todas las muestras, mientras que para el hidrato de citosina, aparece a 11.5° . Esto indica la presencia de 2 tipos diferentes de nanocristales en una misma muestra.

En la Figura 15 a) se observan reflexiones en los materiales P_3 y P_9 que no aparecen en Ca, mostrando mayor intensidad en la muestra P_9 . Esta reflexión se puede atribuir al agente funcionalizante peróxido, y su intensidad, a la cantidad agregada, ya que la diferencia entre ambos materiales es únicamente la cantidad de peróxido presente. Esta situación se observa de igual manera en b) donde se presentan las referencias sin platino de los materiales. La misma reflexión a 11.5° no está presente en la referencia para Ca, y sí en RP_3 y RP_9 , por lo que se puede considerar que el peróxido favoreció la formación de estructuras distintas en la muestra.

5.1.4. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

En las Figuras 16, 17 y 18, se muestran los espectros FTIR de los materiales NPt-X en las regiones de 400 hasta 3200 cm^{-1} .

En la Figura 16, se muestran los espectros FTIR de los materiales NPt-R, Ca, P₃, P₉, así como referencias del agente funcionalizante GABA y el precursor de platino Pt(acac)₂ en la región 600 – 1800 cm^{-1} . En esta región se encuentran los grupos metilo y carbonilo presentes en el enlace Ti-acac.

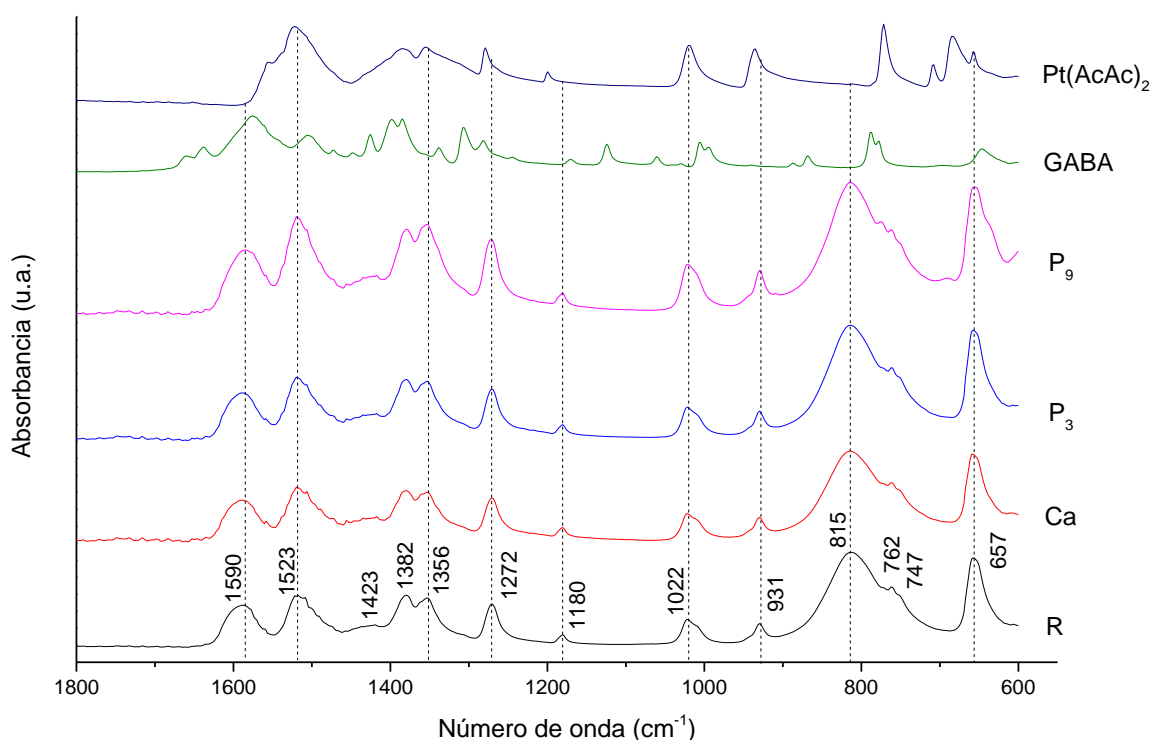


Figura 16. Espectro FTIR obtenido por la técnica de ATR de las nanopartículas R, Ca, P₃ y P₉, así como de los precursores GABA y Pt(acac)₂. Región espectral 600 – 1800 cm^{-1} .

La Figura 16 muestra la región de 600 – 1800 cm^{-1} donde aparecen las bandas con mayor interés para el estudio del complejo Ti-O-acac. La relación entre frecuencias y bandas presentes en el espectro, corresponden a un grupo funcional determinado. Para asignarlas y determinar si existen variaciones, se realiza un comparativo entre los materiales R, Ca, P₃ y P₉ y los precursores de síntesis GABA y Pt(acac)₂ con la finalidad de correlacionar grupos funcionales propios de cada uno de ellos en las nanopartículas.

La señal presente a 657 cm^{-1} se asigna la vibración del enlace Ti-O en la estructura del acetilacetonato. En la región de $700 -1450\text{ cm}^{-1}$ las bandas son asignadas a vibraciones causadas por los grupos CH- de la acetilacetona a la red de titanio-oxígeno. La presencia de dos bandas a 1523 y 1590 cm^{-1} se relaciona con la incorporación del acac al titanio de la red y ausencia de acac libre (Guzmán *et al.*, 2007), que de lo contrario mostraría una única banda a 1620 cm^{-1} .

En la Figura 17, se muestran los espectros FTIR de los materiales NPt-R, Ca, P₃, P₉, en la región $2400 - 3100\text{ cm}^{-1}$.

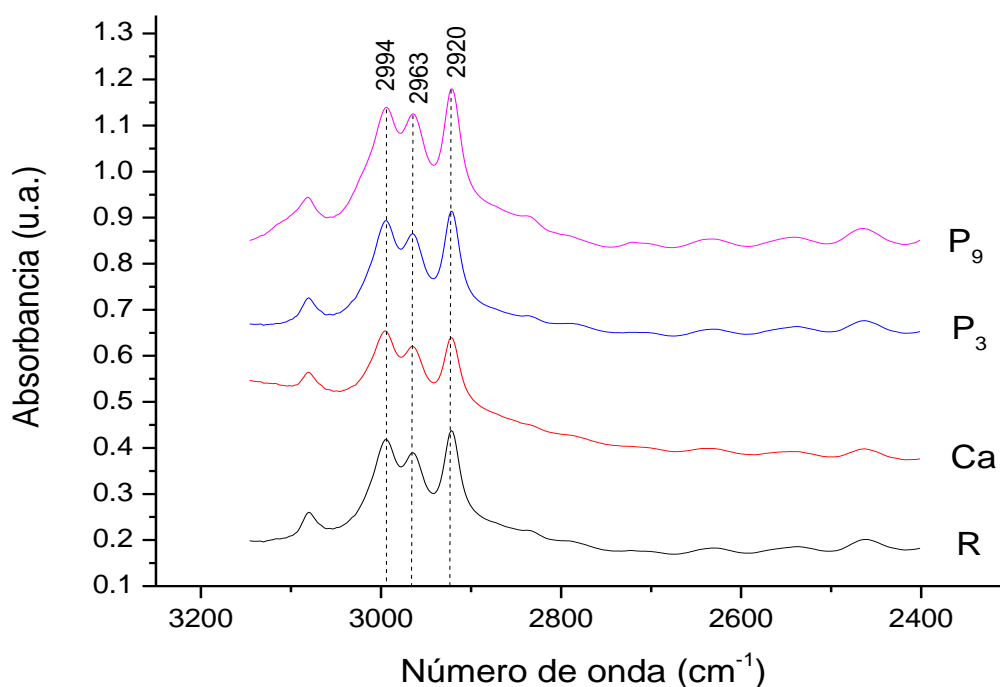


Figura 17. Espectro FTIR obtenido por la técnica de transmisión con KBr de las nanopartículas R, Ca, P₃ y P₉. Región espectral $2400 - 3100\text{ cm}^{-1}$.

La Figura 17 describe las señales de interés en la región de 2900 a 3000 cm^{-1} que se caracteriza por 3 bandas que describen la unión del acac al titanio presente en la muestra, dando indicio a que se ha formado el enlace Ti-acac (Rodríguez-Paez *et al.*, 2004), reafirmando la presencia del compuesto Ti-O-acac. Esto complementa lo descrito en por la Figura anterior en lo referente al compuesto generado.

En la Figura 18, se muestran los espectros FTIR de los materiales NPt-R, RP₃, RP₉, P₃, P₉, en la región 2400 – 3100 cm⁻¹.

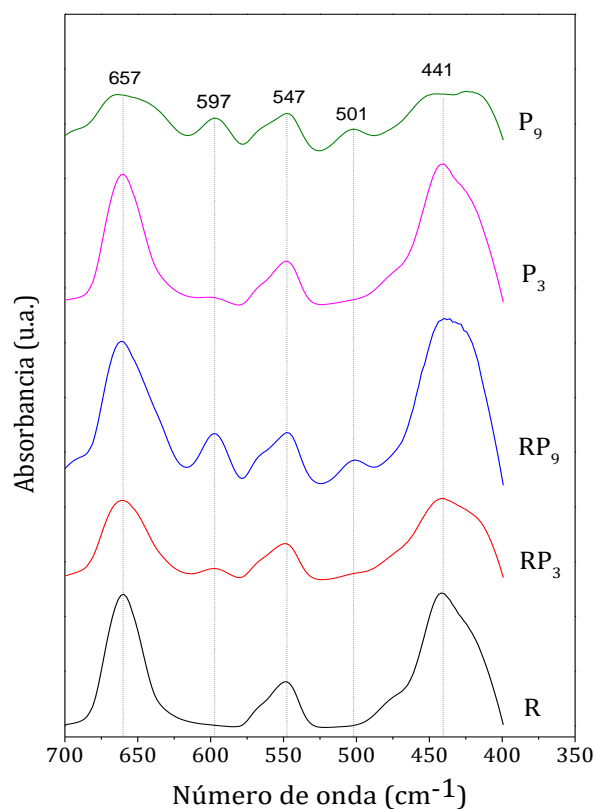


Figura 18. Espectro FTIR obtenido por la técnica de transmisión con KBr de las nanopartículas NPt-R, RP₃, RP₉, P₃, P₉. Región espectral 400 – 700 cm⁻¹.

La Figura 18 muestra la región de 400 a 700 cm⁻¹ de los materiales R, RP₃, RP₉, P₃, P₉ analizados mediante la técnica de transmitancia usando KBr para formar la pastilla a leer. El KBr no absorbe en la región del espectro UV-Vis, por lo que no genera ninguna interferencia con las señales aquí mostradas. La banda presente a 441 cm⁻¹ se relaciona con la vibración producida por el Ti-O-acac.

Para resumir la asignación de grupos funcionales que se muestran en las figuras 16, 17 y 18 según frecuencias en la que aparecen sus bandas, se realizó la Tabla 22 donde se resumen y describen sus características a detalle.

Tabla 2. Asignación de vibraciones del espectro FTIR para los materiales NPt

Frecuencia (cm ⁻¹)	Vibración asociada	Atribución
441	Ti-O-acac	Unión del acac al titanio
657	C-CH ₃ Ti-O	Vibración de los grupos CH ₃ del acac y del enlace Ti-O en deformación del anillo**
747, 762, 1022 y 1272, 1356, 1382, 1423 y 1445	C-CH ₃ CH ₃ , v(C-CH ₃), v(C=C) y v(C=O)	Vibraciones de grupos metilo, carbonilo y doble enlace del acac en el complejo Ti-acac
815	Ti-O	Banda característica del enlace titanio oxígeno
1180	C-N	Vibración correspondiente al GABA
930 y 931	C-C y C-O	Vibraciones (C-O) y (C-C) del TiO-acac
1523 y 1590	C=C y C=O	Grupos del acac unidos al Ti. Un doblete en esta región indica la unión de los ligandos del acac al titanio, por lo que no se encuentra acac libre, que posee una banda ancha a 1620 cm ⁻¹ .
2921, 2964 y 2989	CH ₂ y CH ₃ modo simétrico y asimétrico	Vibraciones del compuesto titanio-acetilacetato que se forma en el sistema Ti-acac

** La expresión deformación del anillo se relaciona con la formación de aspecto coordinativo similar a una estructura bencénica que se puede presentar al combinarse titanio-acac

5.1.5. Espectroscopía Ultravioleta (UV-vis)

En la Figura 19 se muestra el espectro de absorción ultravioleta-visible por reflectancia de difusa de los polvos Ca, P₃ y P₉.

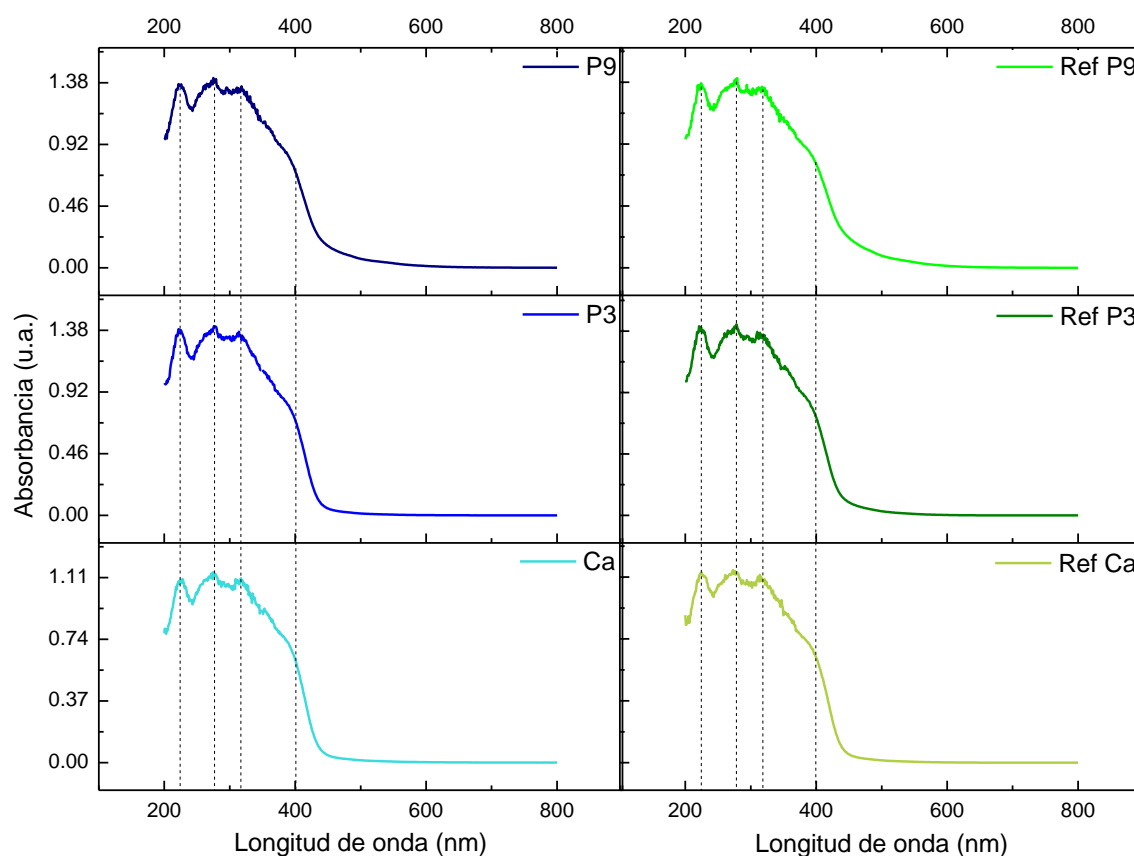


Figura 19. Barrido de absorción UV-Vis de 200 – 800 nm de las muestras Ca, P₃ y P₉

La Figura 19 muestra el espectro por reflectancia difusa con 3 picos máximos de absorción. El primer máximo se encuentra a 220 nm y se atribuye la transferencia de carga causada por la migración electrónica entre el sitio tetraédrico del Ti⁴⁺ y el oxígeno (Tuel & Pfalzgraf, 2003). El segundo máximo local se observa a 270 nm donde tienen su máximo de absorción las especies de titanio parcialmente polimerizadas (5 y 6 coordinado) en pequeños nanodominios (Kim *et al.*, 2000) A 317 nm se da la absorción óptica por transferencia de carga del ligando acetilacetona al ion Ti⁴⁺, situación por la cual se relaciona con la coloración amarilla del material (Guzmán *et al.*, 2007). Por último, se observa la presencia de un hombro a partir de 370 nm, el cual se relaciona con la incorporación del acetilacetonato al material.

Por las absorbancias presentes en los materiales, no hay elementos suficientes que permitan diferenciarlos entre sí. Tampoco es posible notar el cambio producido por la funcionalización entre ellos, por lo que ésta técnica únicamente nos permite predecir la posible formación estructural de la molécula por transferencia de carga.

La absorción para la especie Ti^{4+} se presenta en 350 nm, cuando tiene simetría tetraédrica. En el caso de los materiales sintetizados, podemos observar su presencia a 315 nm, la cual puede deberse a la transferencia de carga del orbital O 2p al Ti 3d (López *et al.*, 2011). La presencia de un pequeño hombro a 400 nm se asocia a la incorporación del acetilacetonato a la red.

5.1.6. Espectroscopía de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS)

En la Figura 20 se muestra el espectro general de barrido XPS de las muestras NPt- Ca, P₃ y P₉.

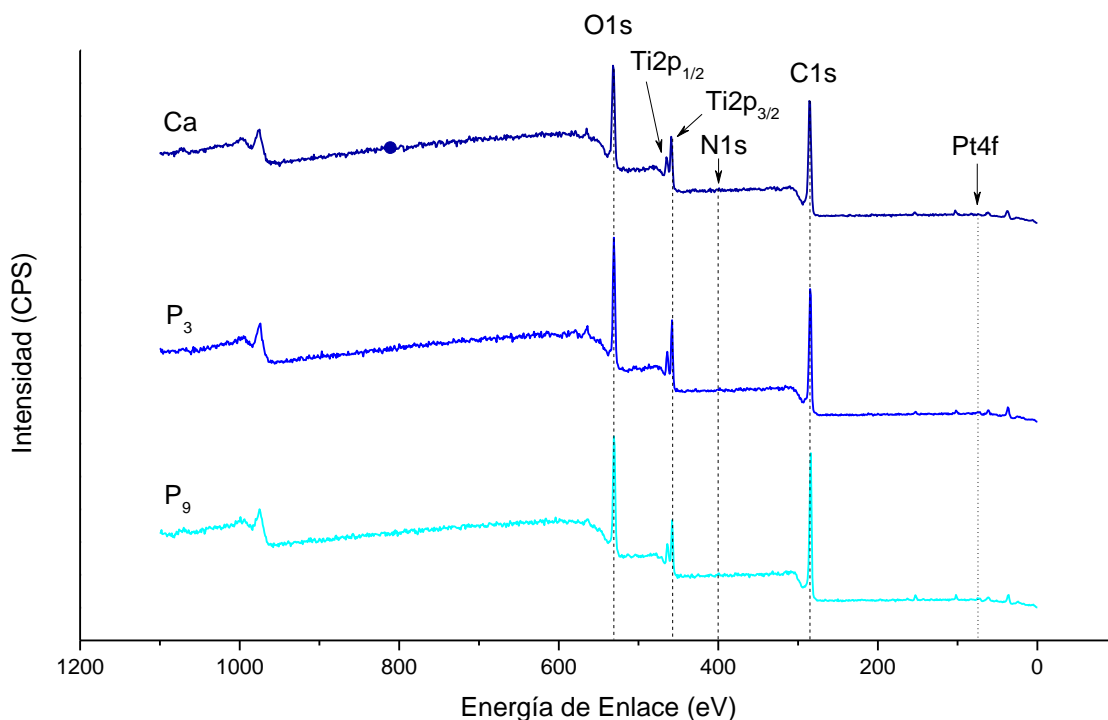


Figura 20. Espectro general de barrido XPS de los materiales NPt – Ca, P₃ y P₉.

La Figura 20, muestra señales características para los elementos que constituyen un material NPt: C, N, O, Ti. En el caso del Pt se puede hacer una correlación inicial por una señal presente a los 70.4 eV. En el espectro general de XPS se pueden observar las bandas características para los elementos C, N, O, Ti y Pt tomando como referencia las BE reportadas en: como se muestra en la tabla X. Se señalan 2 bandas características del Ti en su forma triplete con un acoplamiento spin-órbita de 1/2 y 3/2.

En la Figura 21 se muestra el espectro general de barrido XPS de las muestras NPt- RCa, RP₃ y RP₉.

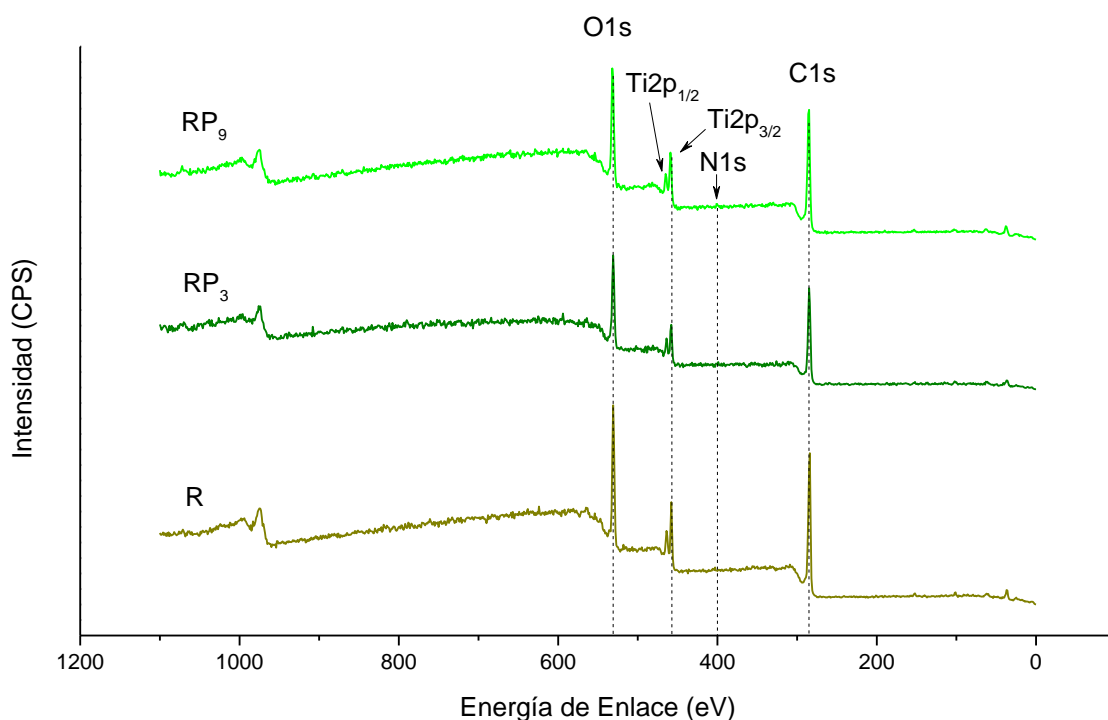


Figura 21. Espectro general de barrido XPS de los materiales NPt – RCa, RP₃ y RP₉.

En el espectro general de barrido amplio se identifican los elementos contenidos en la muestra confirmando la presencia de los elementos C, O, Ti y Pt. Además, aparece una señal para N, elemento estructural de la molécula de GABA, y el cual no había sido visualizado previamente debido a su baja concentración en la muestra.

5.1.7. Análisis Termogravimétrico (TGA)

En la Figura 22 se muestran los termogramas de los materiales R, P3 y P9 donde se observa su estabilidad respecto a la temperatura, así como cambios importantes en la pérdida de material.

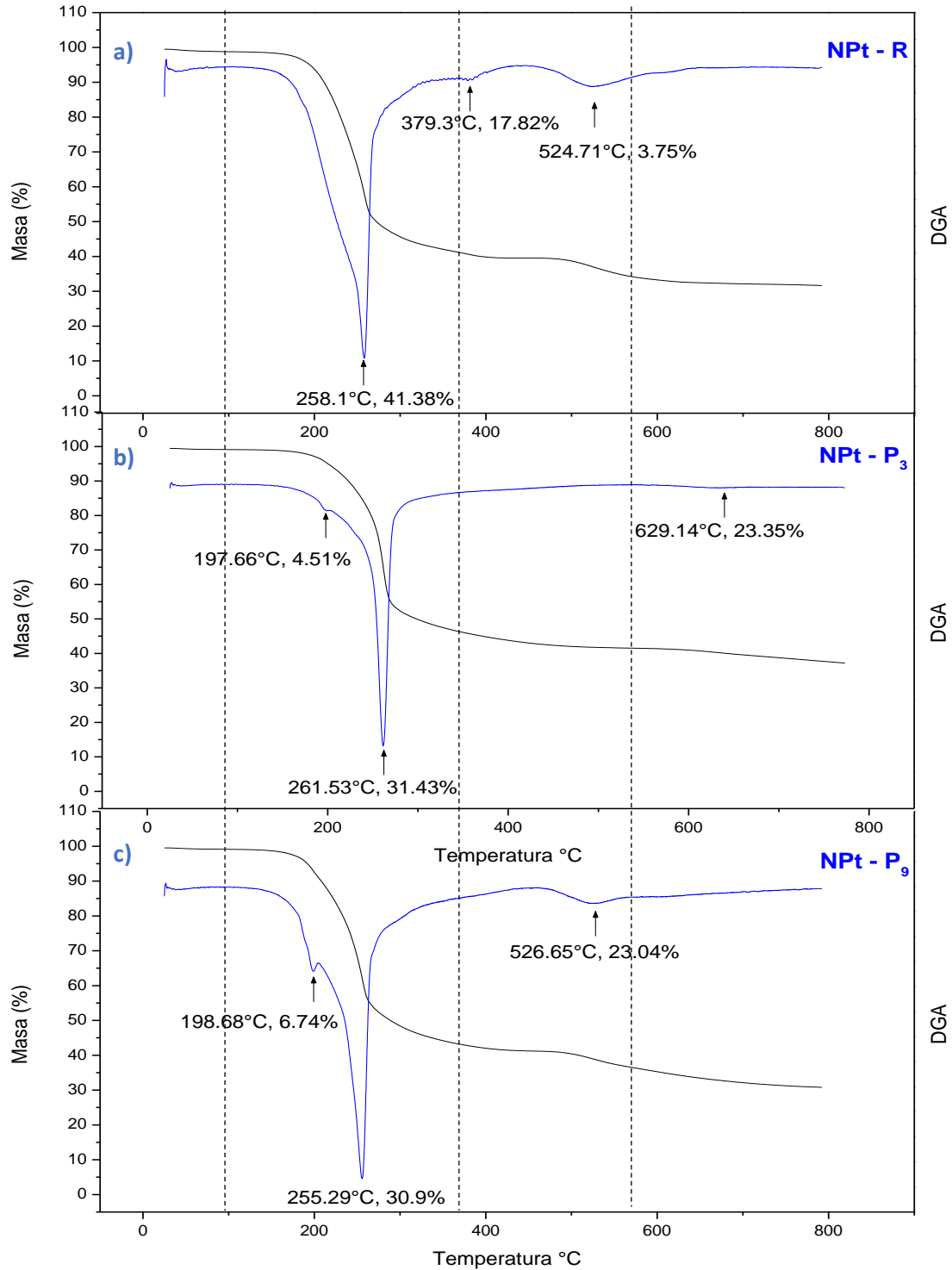


Figura 22. Curvas TGA y DTA de los materiales NPt-R, P₃ y P₉ obtenidas a una tasa de calentamiento de 10°C/min.

La Figura 22 muestra la pérdida de material en 3 fases similares entre los materiales R, P3 y P9, donde además, se obtuvo la primer derivada a lo largo de la curva que nos permite observar la rapidez con la que sucede el proceso de eliminación del material. La primera fase ocurre a una temperatura entre 100 y 350°C aproximadamente donde se pierden principalmente los compuestos volátiles presentes en la muestra que equivalen al 55% en promedio del material en cada caso. La primera derivada es muy pronunciada en esta fase por lo que se puede afirmar que aquí ocurre la pérdida más intensa y más rápida en promedio a los 258°C en las 3 muestras. En la segunda etapa de 350 a 550 °C se eliminan los compuestos orgánicos provenientes en su mayoría del acetilacetona y una menor parte al GABA que en promedio forman el 15% del total. Por último, en la tercera fase se observa una pérdida que pareciera tender a estabilizarse a pesar del incremento de temperatura. Esto se puede asociar a que únicamente quedan los compuestos inorgánicos de Ti y Pt u óxidos de los mismos que no podrán degradarse a las temperaturas alcanzadas durante el ensayo.

La pérdida de material por efecto de la temperatura se compara en la Tabla 3.

Tabla 3. Temperaturas de pérdida significativa de material

	1ª etapa	2ª etapa	3ª etapa
R		258.1	524.71
P3	197.66	261.53	629.14
P9	198.68	255.29	526.65

En la Tabla 3 se observa que hay pérdidas en 3 puntos importantes. Aunque no se señala una temperatura específica en R en la primera etapa, por su forma se puede ver que hay una remoción importante de material a los 200°C. Por otro lado, se observa un comportamiento similar que hace referencia a que las variaciones en los materiales existen, pero son muy pequeñas.

5.1.8. Fisisorción de Nitrógeno (BET)

En la Figura 23 se muestran las isothermas de adsorción de nitrógeno de los materiales Ca, P₃ y P₉.

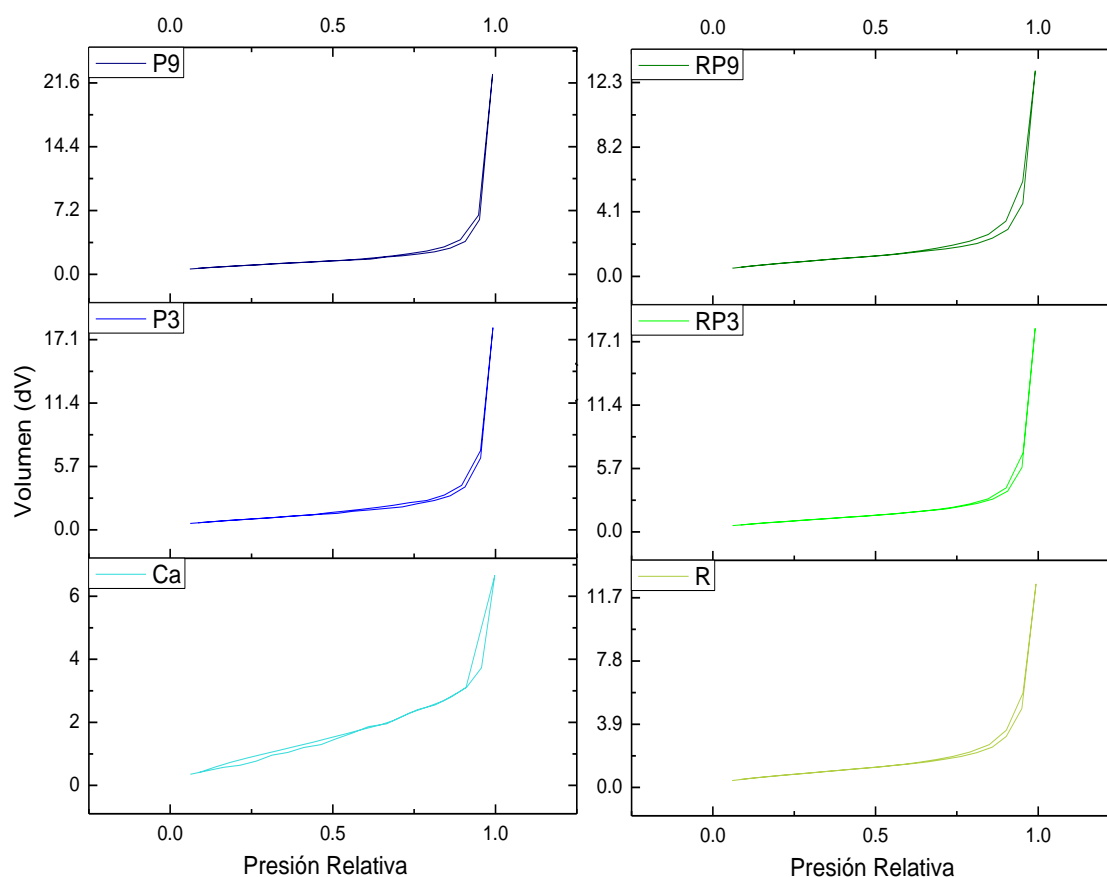


Figura 23. Isotherma de adsorción-desorción de N₂ a 77°K.

La figura 23 muestra isothermas tipo IV clásicas de materiales mesoporosos. Sin embargo, como se mostró en el apartado 5.2, el material se compone de nanopartículas de tamaños que oscilan aproximadamente de los 3 a los 15 nanómetros, y en algunos casos, algunas mayores. Por ello, lo que pueda relacionarse con esta curva sean espacios o huecos que formen las nanopartículas entre sí donde el N₂ se adsorbe para llenar ese hueco y contemplarlo como un poro. Para ello, se realizó el análisis de área superficial que se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Área superficial para las diferentes muestras NPt

<i>Muestra m²/g</i>	Área superficial
<i>R</i>	3.056
<i>C</i>	3.260
<i>RP3</i>	3.636
<i>P3</i>	3.525
<i>RP9</i>	3.698
<i>P9</i>	3.795

La Tabla 4 muestra el área superficial determinada para cada material y aprecia que el valor es muy pequeño, lo cual no podría tener coherencia con la presencia de un material mesoporoso, y apoya la teoría de los huecos entre los materiales.

5.2. Caracterización Biológica

En los siguientes apartados se muestran los resultados obtenidos de las evaluaciones biológicas de algunos materiales NPt con la finalidad de obtener indicios sobre su efectividad en la aplicación como auxiliar en el tratamiento de Fibrosis Pulmonar Idiopática.

5.2.1. Citotoxicidad

En la Figura 24 se muestran las gráficas de viabilidad celular en a) células sanas (FN4) y b) fibróticas de pulmón (HIPF 305).

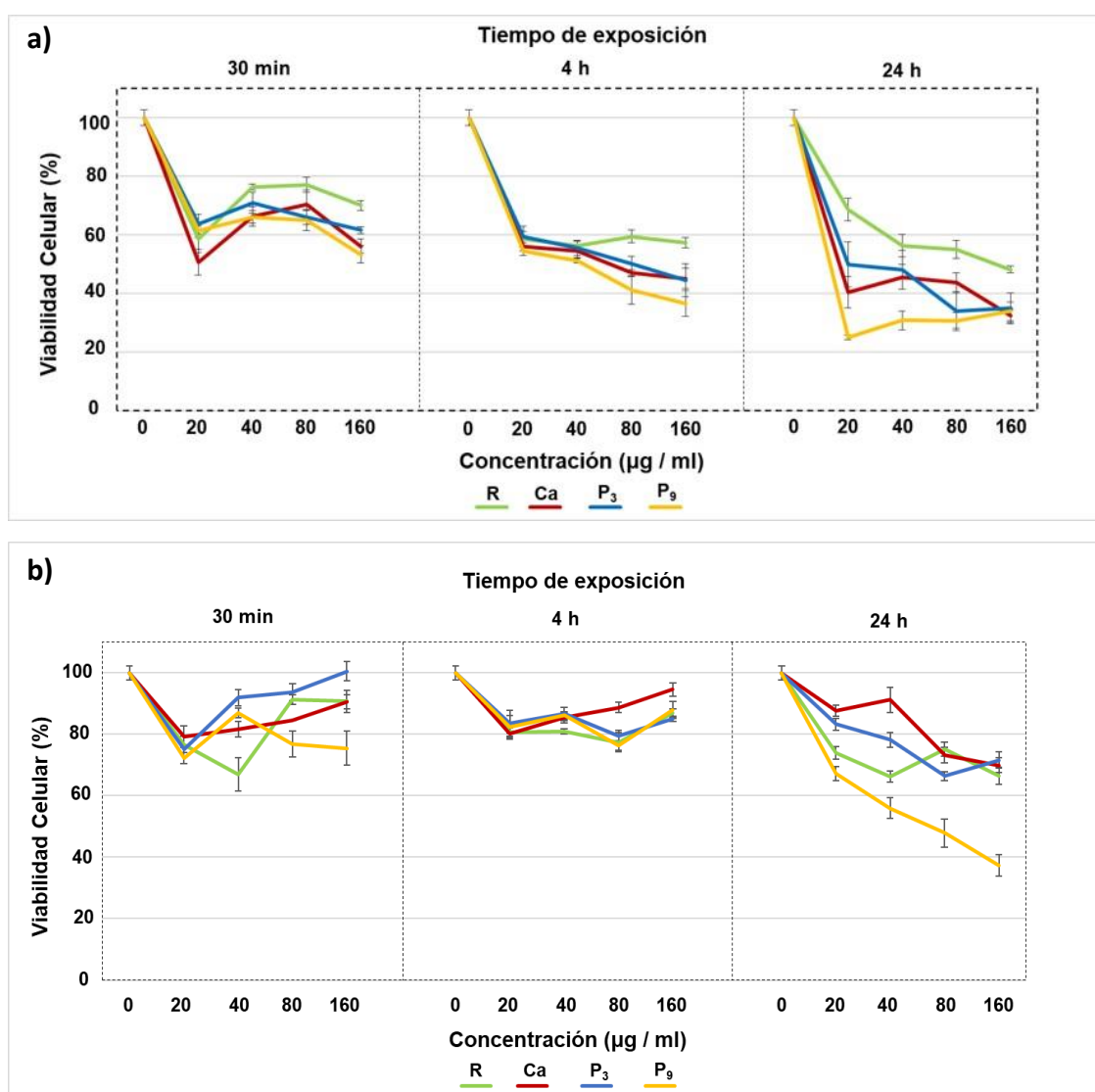


Figura 24. Evaluación citotóxica de los materiales R, Ca, P₃ y P₉ en a) células FN4 y b) células HIPF 305 mediante el ensayo MTT.

La figura 24 muestra la cuantificación del daño biológico (citotoxicidad) causado por el material a las células obtenidas de tejidos primarios. La citotoxicidad evaluada corresponde a los materiales NPt R, Ca, P3 y P9 fue evaluada en fibroblastos sanos (FN4) y fibróticos (HIPF 305).

En el experimento, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de materiales y a diferentes tiempos de incubación con la finalidad de cuantificar el daño celular y establecer relación entre la concentración más efectiva y el tiempo con mayor respuesta. El efecto citotóxico fue medido por la técnica colorimétrica MTT.

La Figura 24 a) muestra la citotoxicidad del material sobre las células FN4, donde se observa una clara disminución de la cantidad de células en la exposición a 20 $\mu\text{g/ml}$ en todos los tiempos. Cuando la concentración aumenta a los 30 minutos, disminuye el efecto citotóxico para posteriormente volver a incrementarse, comportamiento que se repite a las 4 y 24h. Para efectos de citotoxicidad, el material más efectivo es P₉, ya que este alcanza el mayor efecto a las 24h a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$.

La Figura 24 b) muestra los resultados del ensayo de citotoxicidad para las células HIPF 305, donde se observa un patrón de disminución de la viabilidad celular en los 3 tiempos de exposición cuando la concentración de material es de 20 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, en las concentraciones restantes y diferentes tiempos de incubación, existen variaciones en el efecto citotóxico. Esto podría explicarse por el tamaño de y características de las partículas, ya que a 20 $\mu\text{g/ml}$ las partículas se aglomeran menos y pueden existir una mejor interacción con la célula, ya sea para su internalización o algún efecto extracelular. Por otro lado, cuando el material se expone con las células a mayor concentración y tiempo, las nanopartículas P₉ resultan ser las más efectivas, logrando hasta un 60% de citotoxicidad.

5.2.2. Localización intracelular de nanopartículas

5.2.2.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

En la Figura 25 muestra micrografías de transmisión de células HIPF 305 sin y con exposición a nanopartículas.

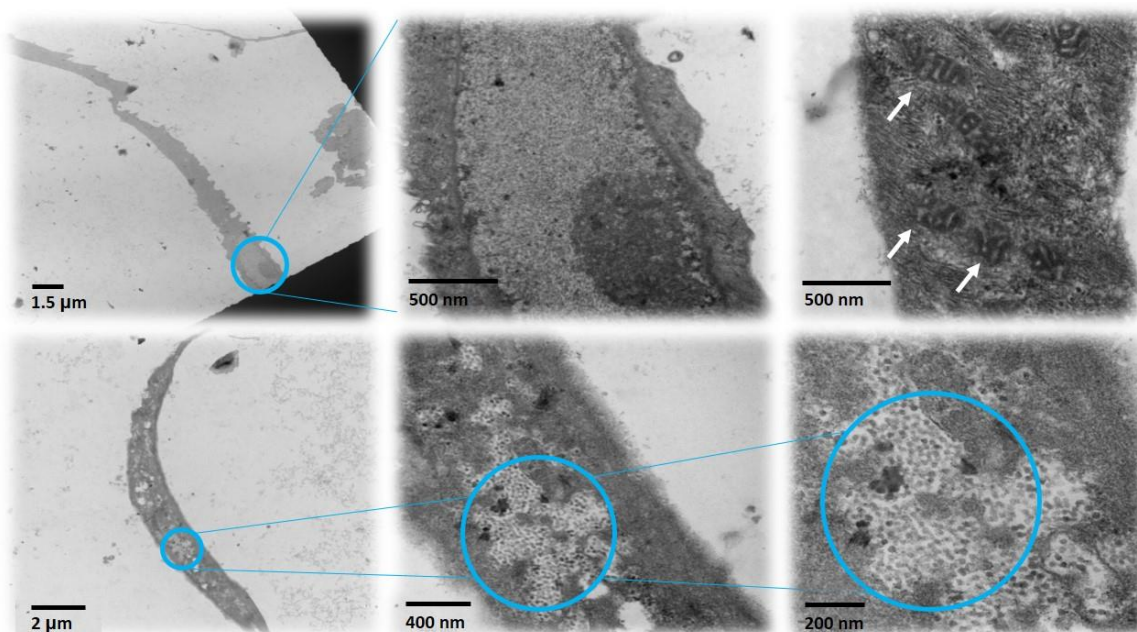


Figura 25. Micrografías TEM de células sin y con exposición de material P3 a concentración 40 μg/ml.

La Figura 25 a) se muestra una célula HIPF 305 sin exposición a nanopartículas, donde se aprecian estructuras celulares como núcleo, nucléolo y mitocondrias, haciendo referencia a una célula íntegra y sin daño celular. En la Figura 25 b), se muestra una célula expuesta a nanopartículas, donde se observan cúmulos de las mismas en el interior de la célula dispersas en el citoplasma.

Con la finalidad de estudiar el comportamiento de las nanopartículas en un sistema biológico *in vitro*, y los componentes del mismo, se realizó una prueba para evaluar el efecto de la interacción entre el medio de cultivo y el material NPT P₃. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 26.

En la Figura 26 se muestra un comparativo de las nanopartículas dentro de la célula y en medio de cultivo.

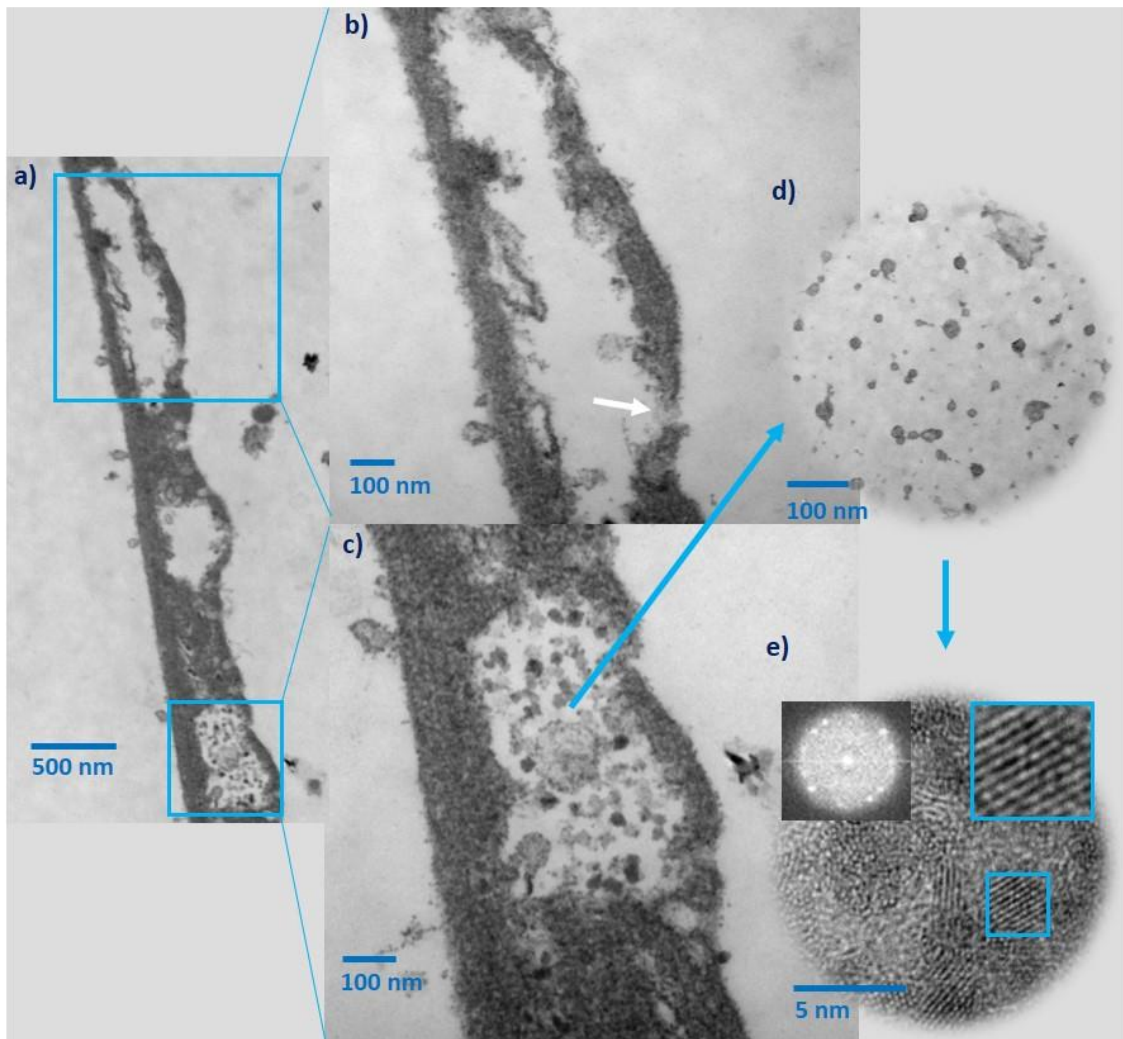


Figura 26. Daño celular con nanopartículas internalizadas. a) Se muestra fibroblasto pulmonar con vacuolas de diferentes tamaños y nanopartículas internalizadas (a). Se observa pérdida de la continuidad en la membrana celular (b), nanopartículas de diferentes tamaños internalizadas (c), comparativo con imágenes HRTEM de nanopartículas dispersas en agua (d) y una vista con mayor acercamiento a las mismas donde se aprecian características de cristalinidad en ellas (e).

La Figura 26 muestra micrografías TEM comparativas de material dentro de una célula y nanopartículas en medio de cultivo, donde observa: a) daño celular y nanopartículas internalizadas, b) pérdida de la continuidad en la membrana celular, c) magnificación de nanopartículas de diferentes tamaños localizadas de manera aleatoria en el citoplasma de la célula, d) nanopartículas en medio de cultivo posterior a 4h de incubación, e) HRTEM de las partículas mostradas en d), donde se observa la presencia de nanocristales menores a 5 nm.

En esta figura se aprecia una similitud morfológica entre lo mostrado intracelularmente y el material expuesto en medio de cultivo que nos orienta a afirmar que es el material P₃ internalizado por la célula lo que distinguimos en c) y d). Lo anterior se realizó a falta de técnicas de composición elemental que nos pudieran comprobar la relación célula – nanopartícula.

5.2.2.2. Microscopía de Fluorescencia

5.2.2.2.1. Marcaje de nanopartículas

La Figura 27 muestra nanopartículas marcadas con RhB-ITC en diferentes canales.

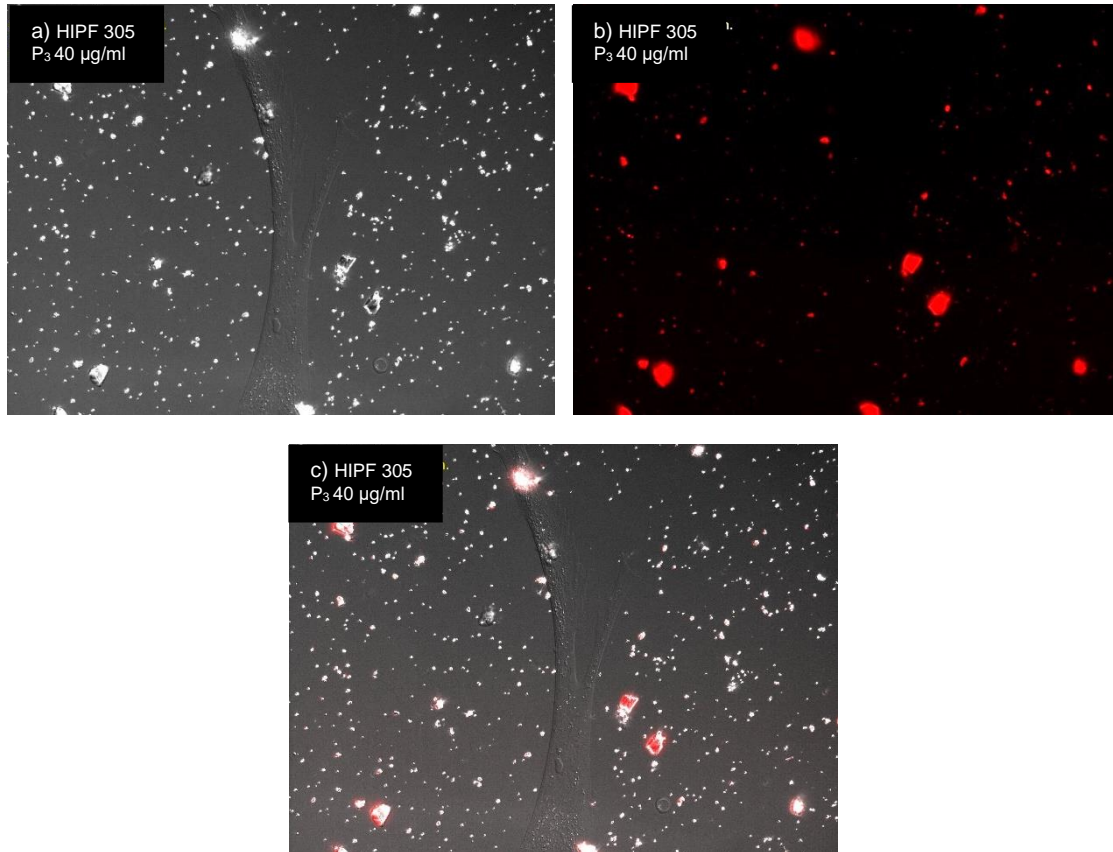


Figura 27. Microscopía de Transmisión y Fluorescencia del material P3 funcionalizado con RhB-ITC. Se observan los canales de a) transmisión, b) fluorescencia y c) superposición de los dos anteriores.

La Figura 27 muestra diferentes canales de la exposición con nanopartículas expuestas a fibroblastos HIPF 305, diferentes longitudes de onda de las. En a) se observa el canal de transmisión donde se identifica la célula y las nanopartículas. En b) se aprecia el canal con la longitud de onda que activa la fluorescencia de la RhB-ITC donde se observan las nanopartículas marcadas, en el cual, se distinguen aglomerados de nanopartículas y partículas pequeñas que fueron marcadas exitosamente. En c) se observa la superposición de las imágenes obtenidas de ambos canales permitiendo ubicar las nanopartículas en su totalidad.

5.2.2.2.2. Time Lapse

La Figura 28 muestra la interacción nanopartícula (P3) – célula (fibroblasto HIPF 305) en un periodo de 2 horas, donde se observan diferentes acontecimientos durante la exposición.

Al tiempo 00:00 se observan en su mayoría nanopartículas extracelulares y alguna que pudiera dar indicio que está sobre la célula, sin embargo, esta partícula no tiene movimiento o alguna interacción. Transcurrida 1h se observa una partícula fluorescente de mayor tamaño que se posiciona del lado derecho de la célula (señalada con una flecha). Conforme el tiempo transcurre, se observa que la partícula es desplazada con dirección hacia el núcleo, hasta que deja de moverse 40 minutos después de su internalización. En la secuencia de imágenes, se puede visualizar claramente la trayectoria, ya que la distancia final respecto al punto inicial es notable. Por otro lado, la partícula extracelular señala con un círculo, también fue movilizadada desde su sitio inicial, en este caso, es una prolongación celular la que se acerca a la partícula y comienza a desplazarla.

De lo anterior podemos afirmar que dentro del material existen estructuras que son de interés para la célula, ya que es ella misma quién lo acepta y desplaza en dirección hacia el núcleo (de manera perinuclear), o emite prolongaciones para adquirirlas del medio externo, queriéndolas incorporar a ella. Esto puede deberse, a que el material tiene compuestos que pueden ser de interés para la célula, como el hidrato de citosina, que fue identificado en el apartado 5.1.3, el cual contiene estructuras similares al ADN.

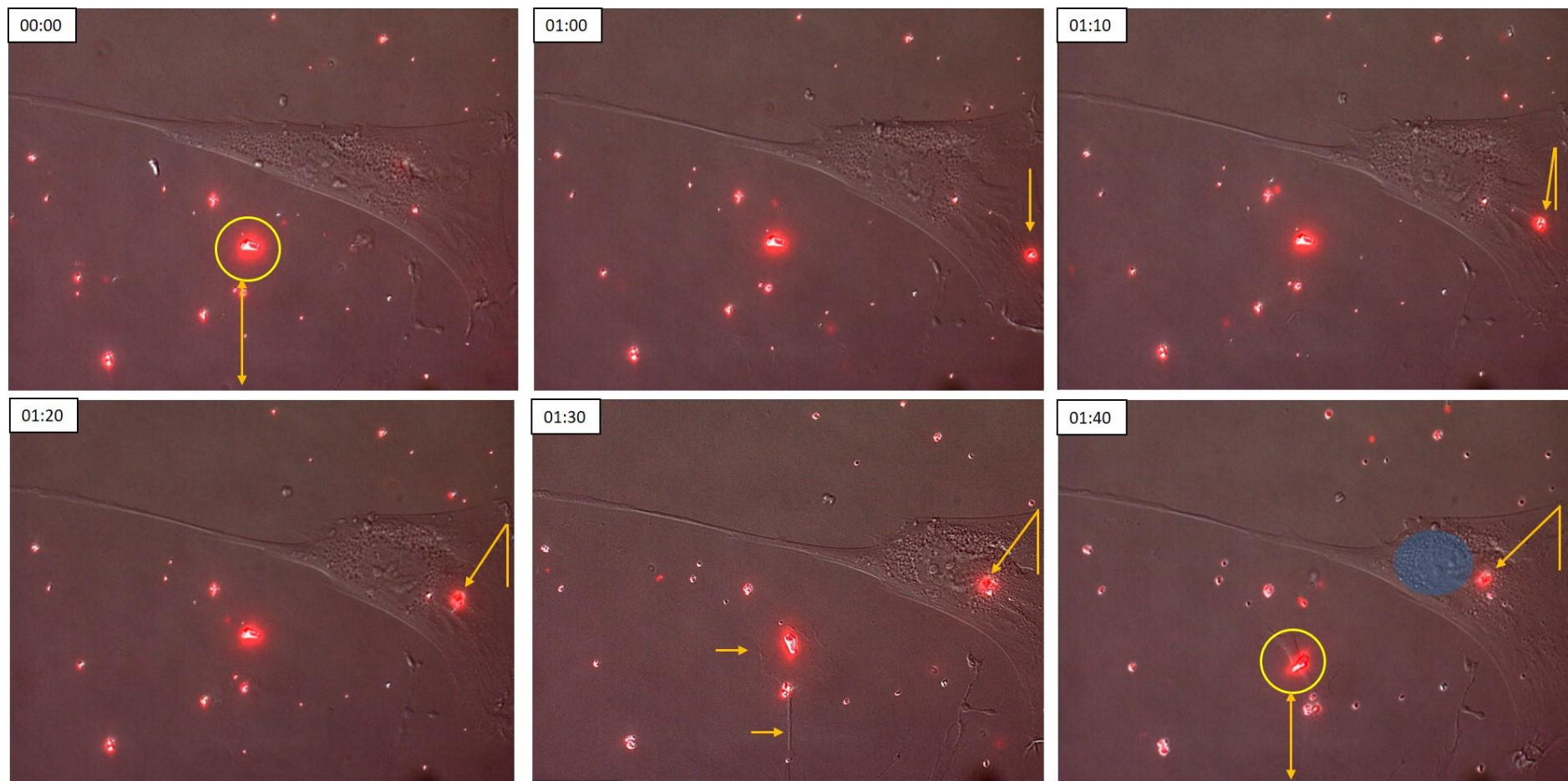


Figura 28. Secuencia de desplazamiento de un aglomerado de nanopartículas al núcleo. Se muestran 6 diferentes tiempos, partiendo desde el inicio de la incubación (00:00), hasta cuando la partícula es transportada en dirección nuclear (1:40). Además, partículas fuera de la célula (00:00), señaladas en un círculo, son alcanzadas por prolongaciones celulares y desplazadas de su sitio original (01:40).

5.2.2.2.3. Reconstrucción 3D

La Figura 29 muestra una técnica de reconstrucción 3D para localización intracelular de nanopartículas.

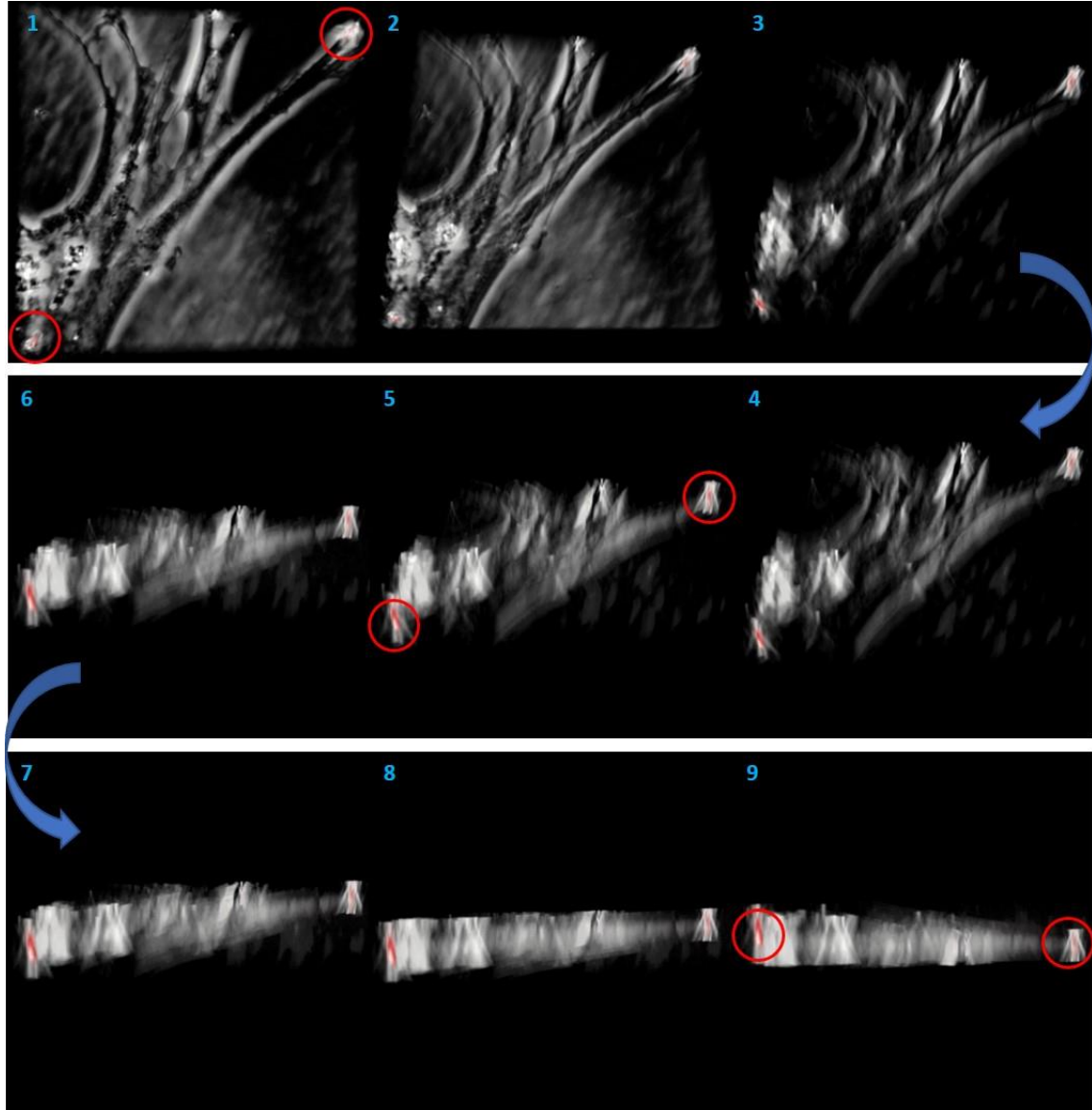


Figura 29. Reconstrucción 3D que muestra localización intracelular de aglomerados de nanopartículas.

En la figura 29 se observan 9 tomas distintas de la compilación de imágenes obtenidas en diferentes planos de la célula, donde se observa en el cuadro 1 la localización sobre la célula de 2 aglomerados. Al ir recorriendo las posiciones, en el cuadro 4 se observa que el material está dentro y no sobre la célula, por su apreciación en el centro y no en la superficie, llegando hasta la posición 9 donde se puede observar más detalladamente.

Lo anterior comprueba que la célula tiene cierta predilección por el material, por lo que, es capaz de ser internalizado. Sin embargo, es necesario estudiar más a fondo la posible interacción nanopartícula célula para poder definir cuál es el mecanismo real que permite la incorporación del material (Park & Oh, 2014), y así saber cómo funcionalizar las nanopartículas de manera específica.

6. CONCLUSIONES

Se logró una modificación de las nanopartículas NPt Ca, obteniendo los materiales P₃ y P₉, en los cuales, se lograron identificar diferencias morfológicas y estructurales mediante su caracterización fisicoquímica.

Los nuevos materiales sintetizados poseen características citotóxicas esperadas para su uso en FPI, llegando a ser P₉ el material más efectivo para matar células profibróticas.

Se deben ampliar los estudios de la interacción célula – nanopartícula con la finalidad de entender el mecanismo de internalización, y así, poder funcionalizar el material de manera adecuada para hacerlo altamente selectivo.

7. REFERENCIAS

- Aluani, D., Tzankova, V., Kondeva-Burdina, M., Yordanov, Y., Nikolova, E., & Odzhakov, F. et al. (2017). Evaluation of biocompatibility and antioxidant efficiency of chitosan-alginate nanoparticles loaded with quercetin. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 103, 771-782. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.062>
- Álvarez, M., Monroy, H., López, T., De la Cruz Hernández, E., & López-González, R. (2016). Effect of surface modification on the bioactivity of sol-gel TiO₂-based nanomaterials. *Journal Of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(8), 2148-2155. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.4915>
- Astruc, D. (2015). Introduction to Nanomedicine. *Molecules*, 21(1), 4. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21010004>.
- Bahadori, M., Mohammadi, F. (2012). Nanomedicine for Respiratory Diseases. *National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease*. 11(4), 18-22.
- Blank, F., Fytianos, K., Seydoux, E., Rodriguez-Lorenzo, L., Petri-Fink, A., von Garnier, C., & Rothen-Rutishauser, B. (2017). Interaction of biomedical nanoparticles with the pulmonary immune system. *Journal Of Nanobiotechnology*, 15(6). <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-016-0242-5>
- Bobo, D., Robinson, K., Islam, J., Thurecht, K., & Corrie, S. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research*, 33(10), 2373-2387. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>
- Brenner, J., Greineder, C., Shuvaev, V., y Muzykantov, V. (2014). Endothelial nanomedicine for the treatment of pulmonary disease. *Expert Opin. Drug Deliv.* 12(2), 1-23.
- Chen, G., Roy, I., Yang, C., & Prasad, P. (2016). Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chemical Reviews*, 116(5), 2826-2885. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00148>
- Caldorera-Moore, M. E., Liechty, W. B., & Peppas, N. A. (2011). Responsive Theranostic Systems: Integration of Diagnostic Imaging Agents and Responsive Controlled Release Drug Delivery Carriers. *Accounts of Chemical Research*, 44(10), 1061–1070. doi:10.1021/ar2001777
- D'Agostino, A., Taglietti, A., Desando, R., Bini, M., Patrini, M., & Dacarro, G. et al. (2017). Bulk Surfaces Coated with Triangular Silver Nanoplates: Antibacterial Action Based on Silver Release and Photo-Thermal Effect. *Nanomaterials*, 7(1),7. <http://dx.doi.org/10.3390/nano7010007>

- Danks, A. E., Hall, S. R., Schnepf, Z. (2016). The evolution of 'sol-gel' chemistry as a technique for materials synthesis. *Materials Horizons* 3, 91-112.
- Divagar, S., Vigneshwar, M., & Selvamani, S. (2016). Impacts of Nano Particles on Fatigue Strength of Aluminum Based Metal Matrix Composites for Aerospace. *Materials Today: Proceedings*, 3(10), 3734-3739. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2016.11.021>
- Gao, L., & Koo, H. (2017). Do catalytic nanoparticles offer an improved therapeutic strategy to combat dental biofilms?. *Nanomedicine*, 12(4), 275-279. <http://dx.doi.org/10.2217/nnm-2016-0400>
- Garbuzenko OB., Ivanova V., Kholodovych V., Reimer DC., Reuhl KR., Yurkow E., Adler D., Minko T., Combinatorial treatment of idiopathic pulmonary fibrosis using nanoparticles with prostaglandin E and siRNA(s), *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (2017), doi: 10.1016/j.nano.2017.04.005
- Guttenberg, M., Bezerra, L., Neu-Baker, N., del Pilar Sosa Idelchik, M., Elder, A., Oberdörster, G., & Brenner, S. (2016). Biodistribution of inhaled metal oxide nanoparticles mimicking occupational exposure: a preliminary investigation using enhanced darkfield microscopy. *Journal Of Biophotonics*, 9(10), 987-993. <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201600125>
- Guzmán A. M., A. M. Fernández, Y. Franco, J. H. Bautista & J.E. Rodríguez Páez. (2007). Estudio de las reacciones de hidrólisis y condensación del titanio en presencia de acetilacetona, *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 31(121): 529-536
- Rev. Acad. Colomb. Cienc. 31(121): 529-536, 2007. Haider, A., Haider, S., Han, S., & Kang, I. (2017). Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review. *RSC Adv.*, 7(13), 7442-7458. <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra26124h>
- He, X., & Hwang, H. (2016). Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *Journal Of Food And Drug Analysis*, 24(4), 671-681. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2016.06.001>
- Huo, M., Wang, L., Chen, Y., & Shi, J. (2017). Tumor-selective catalytic nanomedicine by nanocatalyst delivery. *Nature Communications*, 8(1). doi:10.1038/s41467-017-00424-8
- Karakoçak, B., Raliya, R., Davis, J., Chavalmane, S., Wang, W., Ravi, N., & Biswas, P. (2016). Biocompatibility of gold nanoparticles in retinal pigment epithelial cell line. *Toxicology In Vitro*, 37, 61-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.08.013>
- Ki, J., Jang, E., Han, S., Shin, M., Kang, B., Huh, Y., & Haam, S. (2017). Instantaneous pH-Boosted Functionalization of Stellate Gold

- Nanoparticles for Intracellular Imaging of miRNA. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(21), 17702-17709. <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.6b16452>
- Kiew, S., Kiew, L., Lee, H., Imae, T., & Chung, L. (2016). Assessing biocompatibility of graphene oxide-based nanocarriers: A review. *Journal Of Controlled Release*, 226, 217-228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.015>
- Kim, NK., Kim, GJ. & Ahn, WS. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters* (2000) 71: 273. <https://doi.org/10.1023/A:1010370925267>
- López, T., Ortiz, E., Alvarez, M., Manjarrez, J., Montes, M., Navarro, P., & Odriozola, J. (2010). Catalytic nanomedicine: Functionalisation of nanostructured cryptomelane. *Materials Chemistry And Physics*, 120(2-3), 518-525. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2009.11.049>
- Makled, S., Nafee, N., & Boraie, N. (2017). Nebulized solid lipid nanoparticles for the potential treatment of pulmonary hypertension via targeted delivery of phosphodiesterase-5-inhibitor. *International Journal Of Pharmaceutics*, 517(1-2), 312-321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.026>
- Mejía, M., Buendía, I., Mateos, H. (2016). Primer Consenso Mexicano sobre Fibrosis Pulmonar Idiopática. *Neumol Cir Torax*. 75(1), 32-51.
- Meléndez, F y Chávez, L. (2016). Nanobiomateriales. *Ingenierías*, XIX(70), 55-68.
- Nam, W., Mitchell, J., & Xu, X. (2016). Laser direct writing of modulation-doped nanowire p/n junctions. *Nanotechnology*, 27(48), 485205. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/27/48/485205>
- Pardo, A., Cabrera, S., Maldonado, M., & Selman, M. (2016). Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 17(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s12931-016-0343-6>
- Paris, J., Colilla, M., Izquierdo-Barba, I., Manzano, M., & Vallet-Regí, M. (2017). Tuning mesoporous silica dissolution in physiological environments: a review. *Journal Of Materials Science*, 52(15), 8761-8771. <http://dx.doi.org/10.1007/s10853-017-0787-1>
- Park, J. H., & Oh, N. (2014). Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine*, 51. doi:10.2147/ijn.s26592
- Puglisi, S., Torrisi, S., Giuliano, R., Vindigni, V., & Vancheri, C. (2016). What We Know About the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Seminars*

- In *Respiratory And Critical Care Medicine*, 37(03), 358-367.
<http://dx.doi.org/10.1055/s-0036-1580693>
- Rafiei, P., & Haddadi, A. (2017). Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile. *International Journal Of Nanomedicine*, Volume 12, 935-947. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s121881>
- Rodríguez-Páez, J., Mafla, A., Andrade, G., & Durán, A. (2004). Modificación química del precursor de titanio para obtener soles estables de silice - titania: Uso de acetilacetona. *Boletín De La Sociedad Española De Cerámica Y Vidrio*, 43(1), 53-55. doi: 10.3989/cyv.2004.v43.i1.1044
- Smith, A., & Skrabalak, S. (2017). Metal nanomaterials for optical anti-counterfeit labels. *J. Mater. Chem. C*, 5(13), 3207-3215. <http://dx.doi.org/10.1039/c7tc00080d>
- Sun, B., Zhou, G., & Zhang, H. (2016). Synthesis, functionalization, and applications of morphology-controllable silica-based nanostructures: A review. *Progress In Solid State Chemistry*, 44(1), 1-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2016.01.001>
- Tao, G., Cai, R., Wang, Y., Song, K., Guo, P., & Zhao, P. et al. (2017). Biosynthesis and Characterization of AgNPs–Silk/PVA Film for Potential Packaging Application. *Materials*, 10(6), 667. <http://dx.doi.org/10.3390/ma10060667>
- Thiruppathi, R., Mishra, S., Ganapathy, M., Padmanabhan, P., & Gulyás, B. (2016). Nanoparticle Functionalization and Its Potentials for Molecular Imaging. *Advanced Science*, 4(3), 1600279. <http://dx.doi.org/10.1002/advs.201600279>
- Tuel, A., & Hubert-Pfalzgraf, L. G. (2003). Nanometric monodispersed titanium oxide particles on mesoporous silica: synthesis, characterization, and catalytic activity in oxidation reactions in the liquid phase. *Journal of Catalysis*, 217(2), 343–353. doi:10.1016/s0021-9517(03)00078-2
- Undurraga, P. (2015). Fibrosis Pulmonar Idiopática. *Rev. Med. Clin. Condes*. 26(3), 292-301.
- Wells, Coreena, "Pulmonary Fibrosis" (2016). Master of Science in Nursing (MSN) Student Scholarship. 174.
- Wolters, P., Collard, H., & Jones, K. (2014). Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annual Review Of Pathology: Mechanisms Of Disease*, 9(1), 157-179. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104706>

- Wu, X., Ding, S., Lin, K., & Su, J. (2017). A review on the biocompatibility and potential applications of graphene in inducing cell differentiation and tissue regeneration. *J. Mater. Chem. B*, 5(17), 3084-3102. <http://dx.doi.org/10.1039/c6tb03067j>
- Xu, X., Dai, H., y Wang, C. (2016). Epithelium-dependent profibrotic milieu in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: current status and future directions. *Clin Respir J*; 10, 133–141
- Yegin, C., Lu, W., Kheireddin, B., Zhang, M., Li, P., & Min, Y. et al. (2017). The Effect of Nanoparticle Functionalization on Lubrication Performance of Nanofluids Dispersing Silica Nanoparticles in an Ionic Liquid. *Journal Of Tribology*, 139(4), 041802. <http://dx.doi.org/10.1115/1.4035342>
- Yhee, J., Im, J., y Nho, R. (2016). Advanced Therapeutic Strategies for Chronic Lung Disease Using Nanoparticle-Based Drug Delivery. *Journal of Clinical Medicine*. 5(9), 82-89.