

Portada Externa de Tesis

Autor: Ing. Jesús Roberto Vargas Ortiz

Evaluación toxicológica de materiales
nanoestructurados ($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$,
 $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$) mediante el uso de la
técnica de perfusión de corazón Langendorff

2020



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería



Nombre de la tesis:

Evaluación toxicológica de materiales nanoestructurados
($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$, $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$) mediante el uso de la técnica
de perfusión de corazón Langendorff

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN NANOTECNOLOGÍA



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE MATERIALES CERÁMICOS
NANOESTRUCTURADOS ($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$, $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$) MEDIANTE EL
USO DE LA TÉCNICA DE PERFUSIÓN DE CORAZÓN LANGENDORFF

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta:

Ing. Jesús Roberto Vargas Ortiz

Dirigido por:

Dra. Karen Esquivel Escalante

Dra. Karen Esquivel Escalante

Presidente

Firma

Dra. María del Carmen González Castillo

Secretario

Firma

Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo

Vocal

Firma

Dra. Iliana E. Medina Ramírez

Suplente

Firma

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Septiembre 2020
México

RESUMEN

Las nanopartículas ferromagnéticas, como las nanopartículas de magnetita (MNP) y las nanopartículas magnéticas recubiertas de silicio (CSMNP), han sido objeto de interés en el campo de la medicina por su aplicación en tratamiento, diagnóstico e imagen gracias a sus propiedades magnéticas que les confieren capacidad de navegar remotamente a una dirección específica dentro del ser humano y específicamente en las estructuras que lo conforman, entre muchos otros. Sin embargo, la mayoría de los ensayos informados para evaluar su toxicidad hacen uso sistemas *in vitro* como cultivos celulares primarios, pocos estudios reportan como las MNP interaccionan en sistemas más complejos que permitan evidenciar sus efectos integrales, así como su impacto adverso o benéfico. Un ejemplo de ello es el sistema cardiovascular, quien representa un punto de interacción, contacto y distribución de materiales en dirección a todos los sistemas y órganos del ser humano. Para evaluar el impacto directo de estas partículas en las estructuras cardiovasculares, se utilizó la técnica de perfusión de corazón aislado de rata o preparación de Langendorff. Las MNP se sintetizaron utilizando un método de coprecipitación química asistida por sonoquímica modificada con condiciones básicas de pH y posteriormente recubiertas con sílice utilizando el método Stöber para producir las nanopartículas magnéticas CSMNP. Los resultados muestran que concentraciones relativamente bajas de MNP (0.001, 0.01, 0.1, 1 mgmL⁻¹) modifican la fisiología del corazón aislado y perfundido de la rata, al incrementar significativamente la presión de perfusión, que se considera un índice del tono vascular (proceso de contracción y relajación), desde la primera aplicación de la concentración más baja, que produjo una contracción sostenida, seguida de un bloqueo del efecto clásico de relajación inducido por la acetilcolina (ACh) y alteración en la producción del mediador de relajación vascular, el óxido nítrico (NO) debido a la lixiviación presentada en el material, liberando iones solubles de Fe²⁺ y especies de óxidos en el ambiente. La aplicación de las concentraciones crecientes de CSMNP fueron semejantes a los inducidos por MNP, pero en menor magnitud

gracias a la cubierta parcial de las partículas que impidió la lixiviación de algunas de estas especies.

Palabras clave: Magnetita; Core-Shell; Tono Vascular Coronario; Contractilidad Miocárdica; Óxido Nítrico

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

ABSTRACT

Ferromagnetic nanoparticles, such as magnetite nanoparticles (MNP) and silicon-coated magnetic nanoparticles (CSMNP), have been the subject of interest in the field of medicine for their application in treatment, diagnosis and imaging thanks to their magnetic properties, which give them the ability to remotely navigate to a specific direction within the human being and specifically in the structures that form it, among many others. Nevertheless, most of the assays to evaluate their toxicity use *in vitro* systems such as primary cell cultures, few studies report how the MNP interact in more complex systems that allow evidence of their whole effects, either adverse or beneficial. An example of this is the cardiovascular system, which represents a point of interaction, contact and distribution of materials in the direction of all human systems and organs. In order to evaluate the direct impact of these particles on cardiovascular structures, the isolated rat heart perfusion technique or Langendorff preparation was used. The MNP were synthesized using a modified sonochemical-assisted chemical co-precipitation method with basic pH conditions and subsequently coated with silica using the Stöber method to produce the CSMNP magnetic nanoparticles. The results show that relatively low concentrations of MNP (0.001, 0.01, 0.1, 1 mgmL⁻¹) modify the physiology of the isolated and perfused rat heart, by significantly increasing the perfusion pressure, which is considered an index of vascular tone (contraction and relaxation process), from the first application of the lowest concentration, which produced a sustained contraction, followed by a blockage of the classical relaxation effect induced by acetylcholine (ACh) and alteration in the production of the vascular relaxation mediator, nitric oxide (NO) due to the leaching presented in the material, releasing Fe²⁺ soluble ions and oxide species in the environment. The application of increasing concentrations of CSMNP were similar to those induced by MNP, but to a lesser extent thanks to the partial cover of the particles that prevented the leaching of some of these species

Keywords: Magnetite; Core-Shell; Coronary Vascular Tone; Myocardial Contractility; Nitric Oxide

AGRADECIMIENTOS

A Dios, hoy y siempre.

A la doctora Karen Esquivel, que, sin su apoyo, guía y amistad este proyecto no habría sido posible. Atravesamos muchas complicaciones, pero al final hemos aquí, siempre aquí.

A la doctora María del Carmen Castillo, por sus conocimientos, apoyo, espacio y su tiempo hicieron de este proyecto una realidad.

A mis padres José Roberto Vargas Ortiz y María Gabriela Ortiz Yáñez que siempre estuvieron conmigo apoyándome y alentándome en todas mis decisiones. Los amo mucho y este trabajo es para ellos.

A mi hermana Alejandra Guadalupe, que sin su amistad, perseverancia y correcciones yo no estaría aquí en este momento y este trabajo no hubiera sido lo que es. Te amo mucho.

A mis sinodales, que sin sus comentarios y correcciones a este trabajo no hubiera crecido de la manera que lo hizo y ser el escrito completo y estructurado que es hoy.

A mis amigos, viejos y nuevos que ayudaron con sus risas y compañía a aligerar la carga del trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, cuyo apoyo y camaradería hicieron que el trabajo no se sintiera como tal.

“Do not fear failure. Not failure, but low aim, is the crime. In great attempts it is glorious even to fail”

- **Dark Souls II**

ÍNDICE

Resumen.....	I
Abstract.....	III
Agradecimientos.....	IV
Índice.....	1
Índice de Figuras.....	4
Índice de Tablas.....	7
Glosario.....	8
Capítulo I.....	10
I. Introducción.....	11
Capítulo II.....	16
II. Justificación.....	17
Capítulo III.....	18
III. Descripción del Problema.....	19
Capítulo IV.....	20
IV. Fundamentación Teórica.....	21
IV.1. Nanopartículas Magnéticas.....	21
IV.2. Ultrasonido.....	22
IV.3. Sistema Vascular.....	24
IV.4. Perfusión de Corazón Retrogrado de Langendorff.....	26
IV.5. Sustancias Vasoactivas.....	27
IV.6. Solubilidad y toxicidad.....	30
Capítulo V.....	32
V. Hipótesis y Objetivos.....	33

Hipótesis	33
Objetivo General.....	33
Objetivos Específicos.....	33
Capítulo VI.....	34
VI. Metodología	35
VI.1. Síntesis de los Materiales.....	35
VI.1.1. Síntesis de MNP	35
VI.1.2. Síntesis de CSMNP	35
VI.2. Caracterización Físicoquímica.....	36
VI.3. Abordajes Biológicos	36
VI.3.1. Unidades Experimentales.....	36
VI.3.2. Preparación del corazón aislado y perfundido de Langendorff..	37
VI.3.3. Tratamientos.....	38
VI.3.4. Determinación de Óxido Nítrico (NO)	39
Capítulo VII.....	40
VII. Resultados y Discusión.....	41
VII.1. Caracterización Físicoquímica de las nanopartículas MNP y CSMNP	41
VII.2. Pruebas Biológicas	54
VII.2.1. Análisis de Concentraciones Acumulativas.....	54
VII.2.2. Análisis de Concentraciones Individuales	59
Capítulo VIII.....	66
Conclusiones.....	67
Perspectivas a futuro	68
Referencias Bibliográficas.....	69

Capítulo IX.....	77
VIII. Apéndices	78
A.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	78
A.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	79
A.3. Potencial Zeta	80
A.5. Difracción de Rayos X (XRD).....	81
A.6. Espectroscopía Raman.....	83
A.7. Técnica de perfusión de corazón de Langendorff	83
A.8. Solución de Krebs para la preparación del Langendorff	85

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Diferentes ramas que la Nanotecnología puede adoptar en la industria [6].	12
Figura 2.- Matriz simulada de la estructura atómica de a) Magnetita contra la estructura de b) Maghemita (Óxido de Hierro) donde los átomos de Hierro gris oscuro representan el Fe^{3+} y los átomos de Hierro gris claro representan Fe^{2+} (SOFTWARE VESTA).	21
Figura 3.- Método Stöber de recubrimiento de partículas de Silicio [59].	22
Figura 4.- Representación del efecto de ondas de cierta longitud en un fluido [60].	23
Figura 5.- Componentes hematopoyéticos presentes en el flujo sanguíneo [68].	25
Figura 6.- Vista anterior de la sección frontal del corazón con corte transversal mostrando anatomía interna [68].	26
Figura 7.- Diagrama representativo de la contracción del musculo liso [74].	28
Figura 8.- Diagrama representativo del efecto de la acetilcolina dentro del musculo liso. NO, óxido nítrico; GTP, guanintrifosfato; PPI, pirofosfato inorgánico; IP_3 , inositol trifosfato [68].	29
Figura 9.- Diagrama representativo del efecto de la norepinefrina y el efecto contráctil. Nore, norepinefrina; EPI, epinefrina; Gs, proteína; AC, adenilil ciclase; PDE3, cAMP-dependiente fosfodiesterasa tipo 3; β_1 y β_2 , receptores adrenérgicos beta [68].	30
Figura 10.- Diagrama general representativo del papel que desempeña el hierro dentro del organismo [86].	31
Figura 11.- Esquema en representación de la síntesis de las partículas MNP y CSMNP.	36
Figura 12.- Esquema del equipo Langendorff.	37
Figura 13.- Representación gráfica del registro obtenido del equipo Langendorff.	38
Figura 14.- Reacción de Griess.	39

Figura 15.- Imágenes SEM de a) MNP y b) CSMNP sintetizado y el porcentaje de los elementos presentes en el material obtenido del análisis EDS (normalizado). 41

Figura 16.- Soluciones de nanopartículas en agua (1 y 3) y solución fisiológica de Krebs (2 y 4) de las nanopartículas..... 43

Figura 17.- imágenes TEM de las muestras de MNP a) disueltas en agua y c) y e) en solución fisiológica de Krebs y CSMNP b) disueltas en agua y d) y f) en solución fisiológica de Krebs, respectivamente a una concentración de 0.001 mgmL⁻¹..... 44

Figura 18.- Curvas de potencial Zeta de a) MNP y b) CSMNP. Distribuciones de tamaño de partícula de c) MNP y d) CSMNP. 46

Figura 19.- Espectros XRD de ángulo abierto de a) MNP y b) CSMNP. 48

Figura 20.- Espectros Raman de a) MNP y b) CSMNP. Los grupos de simetría representativos se observan para las posiciones atómicas de la magnetita [102].51

Figura 21.- Análisis obtenido de la histéresis de la balanza de Curie para las partículas magnéticas..... 52

Figura 22.- Curvas de magnetización y análisis de histéresis magnetica de a) MNP y b) CSMNP. 53

Figura 23.- Registros representativos de los controles aplicados (a) sustancias vasoactivas y las concentraciones crecientes de MNP (b) y CSMNP (c) en corazones perfundidos de rata. 56

Figura 24.- Las nanopartículas magnéticas indujeron efectos contráctiles elevados sobre todo en las a) MNP; en las nanopartículas recubiertas se observó un efecto sostenido similar, pero de menor magnitud en c) CSMNP. La producción de NO se vio incrementada después de las administraciones de b) MNP y d) CSMNP. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía contra el control; *p < 0.05, **p < 0.01. 58

Figura 25.- Registros representativos de los análisis individuales de las concentraciones administradas anteriormente, a) 0.001 b) 0.01 c) 0.1 y d) 1 mg/mL de las MNP de forma individual. Se ajustó la escala para apreciar los diferentes efectos de las partículas..... 60

Figura 26.- Registros representativos de los análisis individuales de las concentraciones administradas anteriormente, a) 0.001 b) 0.01 c) 0.1 y d) 1 mg/mL

de las CSMNP de forma individual. Se ajustó la escala para apreciar los diferentes efectos de cada una de las partículas. 62

Figura 27.- Resultados estadísticos de los análisis individuales de las a) MNP; en las nanopartículas recubiertas se observó un efecto dosis - respuesta en c) CSMNP. La producción de NO se vio incrementada después de las administraciones de b) MNP y d) CSMNP. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía contra el control; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.0001. 63

Figura 28.- Ilustración de los efectos que las a) MNP y b) CSMNP pueden tener dentro de los vasos coronarios..... 65

Figura A 1.- Comparación entre el microscopio óptico, microscopio de barrido y de transmisión [120]. 78

Figura A 2.- Señales generadas cuando un haz de electrones de alta energía interactúa con una muestra delgada, la dirección no es necesariamente la dirección que toman las radiaciones dispersas. La mayoría de estas señales se pueden detectar en diferentes tipos de TEM..... 79

Figura A 3.- Posible distribución de cargas entre dos fases mostrando sólo la distribución del exceso de carga. 80

Figura A 4.- Representación gráfica del efecto de difracción que ocurre dentro de las estructuras cristalinas. 82

Figura A 5.- Diagrama de las dispersiones Raman y Rayleigh [81]. 83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Número de productos de acuerdo con el inventario de productos nanotecnológicos (CPI) [7].	11
Tabla A 1.- Solución Madre de la solución fisiológica de Krebs. Esta solución puede ser almacenada por largos periodos a 4°C.	85
Tabla A 2.- Solución Krebs. Esta solución es preparada en el MOMENTO del experimento y NO puede ser almacenada.	85

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

μgdL^{-1} *Microgramos por decilitro* **μm** *Micrómetro* **μM** *Micromolar***AC***Adenilil ciclase***ACh***Acetilcolina* **$\text{Am}^2\text{kg}^{-1}$** *Ampere metro cuadrado sobre kilogramo, unidad de magnetización dependiente de la masa***AMCSD***Base de datos mineralogistas de estructuras cristalinas estadounidenses***ANP***Péptido natriurético atrial***ATP***Adenosín trifosfato***CaM***Calmodulina***cGMP***Guanosín monofosfato cíclico***CPI-17***Inhibidor de proteína fosfatasa 1 potenciado por C-quinasa***GLOSARIO****CSMNP***Nanopartículas con silicio***DAG***Diacilglicerol***EDS***Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X***g***Gramos***GC***Ciclase guanina***GPCR***Receptores acoplados a la proteína G***Gq***Proteína G tipo q***Gs***Proteína G tipo s***GTP***Guanosín trifosfato***IP***Intraperitoneal* **IP_3** *Inositol trifosfato* **IP_3R** *Receptor de inositol trifosfato***kHz***Kilo Hertz, unidad de medida de frecuencia*

LoVo

Línea celular derivada de metástasis de cáncer para pruebas de cultivo celular

mgkg⁻¹

Miligramo por kilogramo

mgmL⁻¹

Miligramo por mililitro

MLC

Miosina de cadena ligera

MLCK

Kinasa de miosina de cadena ligera

MLCP

Fosfatasa de miosina de cadena ligera

mLmin⁻¹

Mililitro por minuto

mmHg

Miligramos de mercurio

MNP

Nanopartículas magnéticas

M_s

Saturación magnética

mV

Milivolts

N₂

Nitrógeno diatómico

nm

Nanómetros

NO

Óxido Nítrico

Nore

Norepinefrina

PDE3

Fosfodiesterasa cAMP-dependiente tipo 3

PIP₂

Fosfatidilinositol difosfato

PKC

Proteína kinasa C

PKG

Proteína kinasa dependiente de cGMP

PLC

Fosfolipasa C

PP

Presión de perfusión

ppm

Partes por millón

ROCK

Kinasa Rho

SEM

Microscopia electrónica de barrido

TEM

Microscopía electrónica de transmisión

XRD

Difracción de rayos X

β₁, β₂

Receptores adrenérgicos beta

CAPÍTULO I

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

I. Introducción

La nanotecnología es responsable de desarrollar nuevos nanomateriales y nanoestructuras con propiedades fisicoquímicas novedosas y únicas atribuibles a su tamaño (1 a 100 nm), la cual ha crecido de forma acelerada en los últimos veinte años debido a las múltiples aplicaciones que se pueden llevar a cabo gracias sus novedosas propiedades [1], [2]. Sin embargo, el acelerado ascenso de la nanotecnología y los grandes beneficios que puede traer junto con ella han opacado a los impactos toxicológicos que son capaces de presentar cuando las cantidades de estas nanopartículas se den en niveles industriales [3].

En la actualidad, diferentes tipos de materiales nanoestructurados (como nanopartículas y nanotubos) tienen diversas aplicaciones en sectores de la vida cotidiana y el sector industrial (**Figura 1**), aportando grandes ventajas en ámbitos tan diversos que abarcan desde la ingeniería hasta la medicina[4], [5], aunque no existen muchas compañías que introduzcan la nanotecnología a sus procesos de producción, esta podría reemplazar materiales existentes para disminuir costos o tiempo de fabricación, o crear maquinaria de ultra precisión [6].

Tabla 1.- Número de productos de acuerdo con el inventario de productos nanotecnológicos (CPI) [7].

Año	Productos Totales	Productos Añadidos	Productos Almacenados
2005	54	54	0
2006	356	302	0
2007	580	278	0
2008	803	223	0
2009	1015	202	107
2010	1015	0	0
2011	1015	0	0
2012	1438	426	0
2013	1628	190	288
2014	1814	238	223

Si la nanotecnología sigue creciendo a este ritmo (**Tabla 1**), en un futuro las compañías producirán grandes cantidades de nanoestructuras y, por consiguiente, nanodesechos, que, así como cualquier reactivo debe de tener regulaciones respecto al correcto uso dentro del área de trabajo y el manejo de estos desechos que se generen al utilizar el producto nanoestructurado. Las nanopartículas tienen grandes aplicaciones en diversas áreas del diagnóstico y tratamiento médico y terapéutico[8].

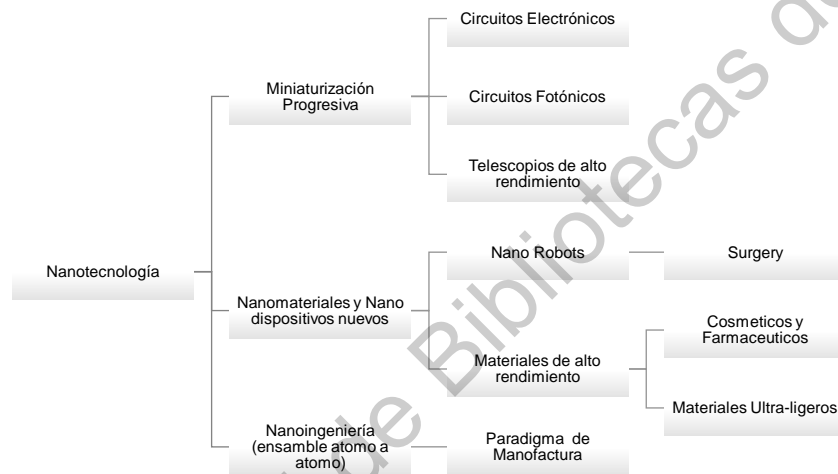


Figura 1.- Diferentes ramas que la Nanotecnología puede adoptar en la industria [6].

Uno de los materiales para elaborar nanopartículas es la plata (AgNP) dados sus efectos antimicrobianos. Estas partículas son uno de los nanomateriales utilizados con mayor frecuencia en los productos bactericidas para desinfección de productos de consumo humano. Adicionalmente, se han elaborado AgNP para el tratamiento contra el cáncer [9], por lo que se están realizando análisis toxicológicos para evaluar su impacto en el sistema circulatorio [10]. Así como la plata, existen también múltiples nanomateriales con propiedades de interés para una mejor liberación y dirección selectiva de fármacos, como la magnetita [11], utilizada en diversas investigaciones destinadas para estudiar su impacto y consecuente aplicación en el tratamiento para atacar enfermedades, como el cáncer [12], por lo tanto, se necesita una comprensión exhaustiva de su toxicidad [13].

En el 1992, diferentes agencias de control de químicos alrededor del mundo se dieron a la tarea de implementar regulaciones o leyes para el correcto uso y disposición de productos químicos, pero esto dio como resultado una discrepancia entre los datos de seguridad de una misma sustancia química en diferentes países, debido a los cambios de temperatura y presión debido al clima y altitud, lo cual resultó en dificultades respecto a cómo se llevarían a cabo distintas actividades como la clasificación de los riesgos de las sustancias químicas y su comercio a nivel mundial [14]. Es aquí donde la Organización de las Naciones Unidas (ONU) llevo a cabo la implementación de un Sistema Globalmente Armonizado (GHS por sus siglas en inglés) [15], el cual estandarizó la comunicación de riesgos internacionalmente en el año 2000. Actualmente, existen diversas agencias alrededor del mundo que se dedican a regular estos mecanismos, como es el caso de la legislación de registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas o REACH, por su abreviación en inglés, que radica principalmente en la Unión Europea y se encarga de evaluar los riesgos que pueden ocasionar los químicos y posee un apartado sobre nanomateriales; sin embargo, no existen aún medidas de seguridad dado que sólo existen regulaciones generales por la morfología de las partículas y lo asocian a las evaluaciones de seguridad química general [16], [17]. La definición dentro de esta norma de la clasificación de compuestos nanoestructurados, o los riesgos que se presentan al utilizarlos está bajo construcción desde el 2013, y la gran variedad de materiales nanoestructurados a evaluar es inmensa[18].

En México existen ciertas regulaciones que están relacionadas con los puntos discutidos en el GHS [19], [20], que plantean los estándares para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas, proveen los parámetros para el manejo y seguridad de las personas involucradas en la manipulación de estas sustancias en un ambiente laboral. Pero al igual que en la legislación europea, aun no existen protocolos para el correcto uso de las nanopartículas o sus riesgos al manipularlas.

La magnetita ($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$) y la maghemita ($\gamma\text{-Fe}^{3+}_2\text{O}_3$), conformados principalmente por hierro, es un mineral común encontrado en la corteza terrestre, por lo que no existiría razón para pensar que pudiera tener efectos negativos dentro del cuerpo. Es así como la magnetita se volvió uno de los primeros materiales nanoestructurados (primer material óxido metálico) en ser aprobado clínicamente como fármaco [21], utilizado como material de contraste, liberación de fármacos, entre otros [22], [23].

Los ensayos actuales para determinar la toxicidad de un material se basan en pruebas de viabilidad celular mediante cultivos celulares de líneas específicas, como la A₅₄₉ (línea celular de pulmón) [24], debido a la evidencia existente que indica que las nanopartículas de magnetita son fácilmente inhaladas y adheridas en tejido pulmonar [25], [26]. Sin embargo, las nanopartículas no han sido evaluadas en el tejido diana en el que las nanopartículas tendrán su aplicación final, el sistema cardiovascular.

Existen diferentes métodos de ensayo para determinar la toxicidad de materiales y químicos, entre las cuales se encuentran las pruebas *in vivo* y las pruebas *in vitro* [27]. Estas últimas presentan ventajas evidentes sobre otros métodos, entre las que se encuentran la rapidez de los resultados, el relativo bajo costo y el uso reducido de exposición en animales vivos [28]. No obstante, las nanopartículas han presentado diferentes comportamientos debido a factores como su tamaño y forma, que les confieren diferentes propiedades fisicoquímicas, su habilidad para formar suspensiones estables en medios biológicos y su facilidad para formar agregados de mayor orden de dimensión [29], [30]. Esta última en particular ha causado discusiones entre si es algo benéfico para una nanopartícula o si es responsable de causar toxicidad. Es sabido que partículas muy pequeñas, del orden de 30 nanómetros [31]–[34] puede atravesar la membrana celular e incluso penetrar el núcleo de está provocando daños al DNA, convirtiéndolo en un potencial agente carcinógeno. Por el otro lado, existen estudios que proponen que la agregación

produce el efecto toxicológico en el organismo [35], ya que al conglomerarse las nanopartículas pueden llegar a sobrepasar la concentración mínima para que un compuesto sea tóxico, en el caso del Hierro en estado férrico (Fe^{3+}), el cual es insoluble, se encuentra alrededor de $350 \mu\text{gDL}^{-1}$ [36].

Recientemente, se han realizado ensayos sobre tejido vivo utilizando la técnica *ex vivo* de perfusión retrograda de corazón de rata para estudiar los efectos toxicológicos de nanopartículas de plata por sus aplicaciones en la medicina como agentes de control de cáncer de colon [37]. Por otro lado, la perfusión retrograda en el corazón aislado se ha utilizado ampliamente en estudios relacionados con la regulación del metabolismo muscular. Esta preparación *ex vivo* ofrece numerosas ventajas sobre otras preparaciones de corazón músculo esqueléticas [10]. Ramírez *et al* 2017 mostraron que las nanopartículas de plata modificaron el tono vascular de las coronarias y la contractilidad del miocardio, así también los estudios de Razavian y Masaimanesh [38] evidenciaron que la exposición a altas concentraciones de nanopartículas de plata ($> 95 \mu\text{gml}^{-1}$) durante períodos prolongados puede inducir una presión arterial alta, mientras que tamaños de partícula menores a 20 nm después de 24 h de exposición, se incrementaron los niveles de las especies reactivas de oxígeno intracelulares observado en células LoVo (células derivadas de metástasis) [37].

Al presentar la magnetita estas interesantes propiedades y posibles aplicaciones en una amplia gama de sectores, se debe asegurar el correcto uso y disposición de este material, para evitar así los posibles efectos que pueda llegar a presentar, ya sean adversos o benéficos.

CAPÍTULO II

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

II. Justificación

Dada la aplicación final de los compuestos de magnetita como agente de contraste [23], agente farmacológico [39] o al tratarlo en la industria [40], el material puede entrar en contacto con el ser humano y provocar diversos efectos desconocidos dentro del cuerpo y ya que el sistema vascular entra en contacto con todas las sustancias que entran al cuerpo [41], se vuelve un sistema importante a estudiar. Para este propósito, mediante la técnica de perfusión de corazón de rata [42]–[44] se pueden lograr ensayos que presentan diversas ventajas ante las pruebas *in vitro*, como reducir el trato de animales y obtener una serie de datos en un tejido específico [45]. Sin embargo, la mayoría de los compuestos nanoestructurados no han sido sometidos a dichos ensayos, que podrían brindar información y conocimiento acerca de su forma de actuar, así como novedosas propiedades que podrían impactar en la generación de dispositivos o fármacos, o bien en la generación de evidencias sobre su potencial toxicológico en función de las concentraciones utilizadas. Para el presente trabajo, se evaluaron como los compuestos de $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ (MNP) y recubiertos con silicio (CSMNP) que pueden ser utilizados como potenciales principios activos alternativos en una gran variedad de tratamientos en la medicina, desde imagenología, liberación de fármacos y diagnóstico y tratamiento [9-37,38].

CAPÍTULO III

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

III. Descripción del Problema

Existen materiales nanoestructurados como las MNP y CSMNP que son canalizados hacia el tratamiento de enfermedades como el cáncer, que han mostrado resultados prometedores sin el comportamiento agresivo de las terapias actuales de radiación. Sin embargo, estos compuestos pueden llegar a presentar cierto nivel de toxicidad en el cuerpo humano, el cual en la actualidad no se tiene un conocimiento base para saber cómo reaccionaran estos compuestos una vez dentro del cuerpo, la potencial toxicidad que produzcan estas nanopartículas una vez que lleguen a su aplicación final, es decir, los efectos benéficos o adversos que pueden presentar a los organismos vivos, incluyendo a los seres humanos, por lo que la necesidad de crear regulaciones y ensayos toxicológicos para estas nuevas nanoestructuras crece junto con estas.

CAPÍTULO IV

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

IV. Fundamentación Teórica

IV.1. Nanopartículas Magnéticas

El óxido ferroso-diférrico u óxido de hierro ($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$), conocido de manera más común como Magnetita, posee dos iones diferentes de hierro, Fe^{2+} y Fe^{3+} en una disposición cristalina de “espinel” o magnetita (AB_2X_4) con un grupo espacial en $Fd\bar{3}m$ sintético [48], establecidos en un arreglo de celda cúbica centrada en las caras por los oxígenos, con los iones hierro ocupando los sitios intersticiales.

Al formarse los iones Fe^{2+} , se remueven los dos electrones del orbital $4s$, pero los cuatro electrones desapareados del orbital $3d$ permanecen en el átomo de Hierro, provocando que la fuerza magnética del dipolo Fe^{2+} sea de cuatro magnetones de Bohr. En cambio, cuando se forma el ion Fe^{3+} , se remueven un electrón del orbital $3d$ y ambos electrones del orbital $4s$, por lo que los electrones desapareados del orbital $3d$ dan un total de cinco y, por lo tanto, la fuerza del dipolo resulta de cinco magnetones de Bohr (**Figura 2**) [49].

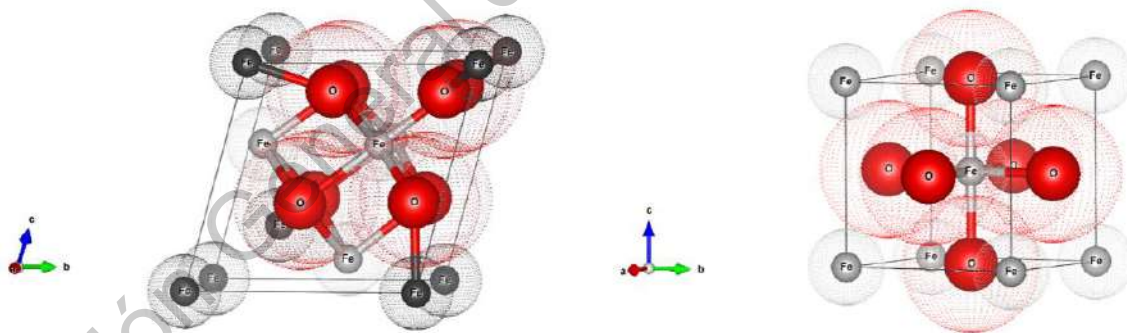


Figura 2. Matriz simulada de la estructura atómica de **a)** Magnetita contra la estructura de **b)** Maghemita (Óxido de Hierro) donde los átomos de Hierro gris oscuro representan el Fe^{3+} y los átomos de Hierro gris claro representan Fe^{2+} (SOFTWARE VESTA).

Gracias a estas propiedades, la magnetita ha sido muy estudiada dado que puede tener numerosas aplicaciones en ámbitos tan diversos desde la medicina, tanto de diagnóstico, como agente acarreador o inclusive como principio activo o biomarcador [41–44], hasta como soporte para materiales con actividad

fotocatalítica utilizados en el tratamiento de contaminantes en agua, aire o cultivos, por lo que la recuperación del material es importante tener en consideración, mediante campos magnéticos debido a la implementación de magnetita [44–48].

Dicho esto, la magnetita estará entonces en contacto continuo con personal médico, trabajadores en la industria, pacientes y múltiples personas una vez que estas aplicaciones alcancen la etapa de producto y dada la naturaleza tóxica del hierro en bulto ($350 \mu\text{gD}^{-1}$) (0.35 ppm) [57], las nanopartículas de magnetita podrían presentar una toxicidad aún mayor. Algunos proponen que las MNP sean recubiertas por otro tipo de materiales como el silicio para proporcionar una mayor biotolerancia dado que el silicio requiere concentraciones mayores a 200 mgmL^{-1} ($2 \times 10^5 \text{ ppm}$) [58] para empezar a ocasionar efectos adversos en sistemas biológicos, como la silicosis. El silicio es una opción viable para reducir la toxicidad del hierro, además de ser adecuado para formar sitios para funcionalización, almacenamiento, transporte o interactuar con grandes cantidades de materia en un espacio muy reducido (**Figura 3**) [59].

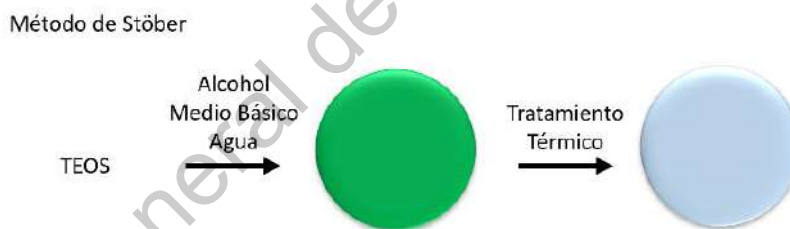


Figura 3. Método Stöber de recubrimiento de partículas de Silicio [59].

IV.2. Ultrasonido

La sonoquímica es un campo de investigación que estudia el análisis y la aplicación de reacciones químicas inducido por el efecto de la radiación ultrasónica en pequeñas burbujas de gas o partículas sólidas mezcladas en un medio líquido. Cuando estas partículas vibran en el fluido, ya sea un gas o líquido, el fluido directamente en contacto con la superficie vibratoria es desplazado por el componente del movimiento normal a la superficie [60].

Como consecuencia de este movimiento, la presión en la capa cercana a la superficie aumenta o disminuye instantáneamente por la acción de contracción o expansión, respectivamente, generando cambios de presión transitorios los cuales moverán las partículas vecinas del fluido más allá de esta capa, y así sucesivamente. Sin embargo, éste movimiento suele ser agresivo para determinadas síntesis, por lo que para generar el efecto similar se aminora la intensidad de la fuente, utilizando un área de acción más amplia conocida como ultrasonido (**Figura 4**) [61]. El movimiento periódico que se propaga de tal manera es una onda de sonido. Dicha onda también se llama onda longitudinal u onda estacionaria [62].

La formación de estructuras con cierta morfología, tamaño, orientación o propiedades específicas requiere de grandes cantidades de energía que se deben suministrar al sistema para promover el acomodo deseado, utilizando condiciones de temperatura y presión en extremo altas. Sin embargo, estas condiciones pueden ser condiciones muy agresivas para la formación de estructuras magnéticas específicas, siendo ideal el ambiente que generan los choques de las ondas ultrasónicas por el colapso de las burbujas para la administración de energía a este tipo de sistemas [63].

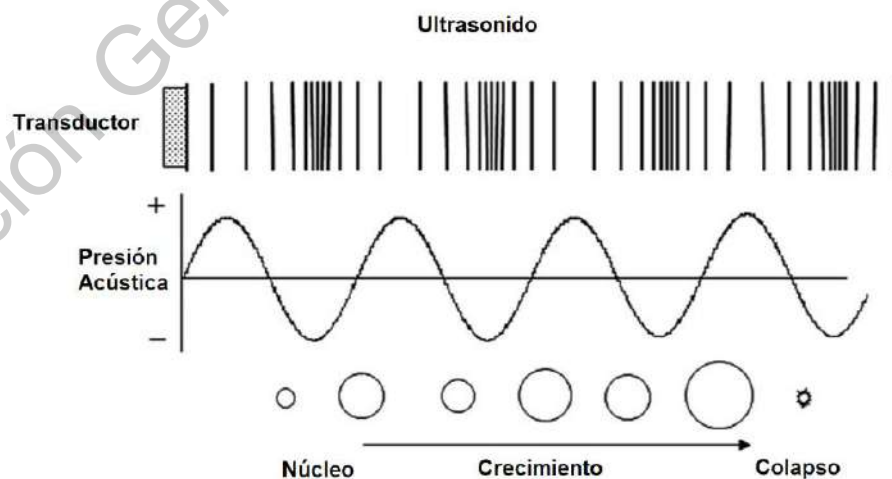


Figura 4.- Representación del efecto de ondas de cierta longitud en un fluido [60].

Estas condiciones de síntesis han probado ser de utilidad para reacciones donde se requieren estructuras poco comunes como las espinela de hierro, formando estructuras definidas bajo el ambiente reductor de ciertas sustancias como el hidróxido de amonio [54] o estructuras definidas mediante otro tipo de ambientes controlados [52,54].

IV.3. Sistema Vascular

En un organismo multicelular que posee complejos sistemas conformados por millones de células cumpliendo diferentes funciones en distintos lugares específicos, muchas células no pueden moverse con la libertad para acceder a oxígeno o nutrientes ni eliminar los productos secundarios de su metabolismo, como dióxido de carbono u otros que pueden ser denominados desechos [67].

Para resolver esta necesidad de comunicación y transporte, estos organismos multicelulares utilizan dos vías hidráulicas: sangre y diversos fluidos intersticiales, pero el principal método de transporte se debe a el sistema cardiovascular a través de la sangre, definida como el tejido conectivo compuesto de una matriz extracelular líquida (plasma) que presenta en suspensión las células completas (glóbulos rojos, blancos y plaquetas) junto con fragmentos celulares o de gran tamaño (**Figura 5**) [68]. La sangre cumple con ciertas funciones, entre ellas transporte de nutrientes y desechos, regulación de una gran variedad de parámetros como el pH (ligeramente alcalino, entre 7.35 a 7.45), temperatura corporal (38 °C, un grado y medio más alta que la temperatura corporal) y protección mediante la creación de coágulos gracias a las plaquetas y defensa por las células blancas [41].

Componentes de la Sangre

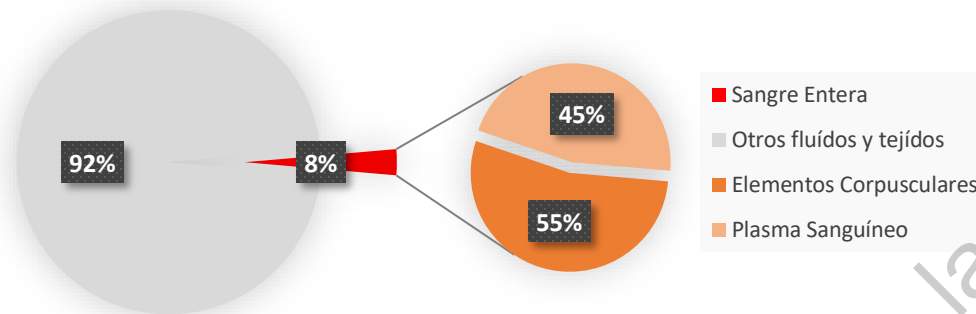


Figura 5.- Componentes hematopoyéticos presentes en el flujo sanguíneo [68].

Para realizar la correcta distribución de la sangre a todos los tejidos del organismo, los organismos multicelulares desarrollaron un sistema hidráulico de transporte para la sangre, denominado sistema vascular, y regulado en su mayoría por el corazón, que actúa como bomba para circular la sangre a través del cuerpo [69].

El corazón está conformado por cuatro cámaras principales (dos aurículas y dos ventrículos) localizados en la parte superior (aurículas), ocupando el mayor espacio e inferior (ventrículos), terminando en la punta del ápice el ventrículo izquierdo (**Figura 6**). Cada vez que las cámaras del corazón se contraen, empujan un volumen de sangre hacia un ventrículo o fuera del corazón (arterias). Las válvulas se abren y cierran en respuesta a los cambios de presión a medida que el corazón se contrae y relaja. Cada una de las cuatro válvulas ayuda a garantizar el flujo unidireccional de sangre al abrirse para dejar pasar la sangre y luego cerrarse para evitar su flujo de retorno [68]. El corazón, al ser un tejido, necesita su suministro de sangre para llevar oxígeno y nutrientes a él, mediante los vasos coronarios que están ubicados entre la pared de pericardio y endocardio, con un tamaño aproximado de 262 μm los de mayor tamaño [70].

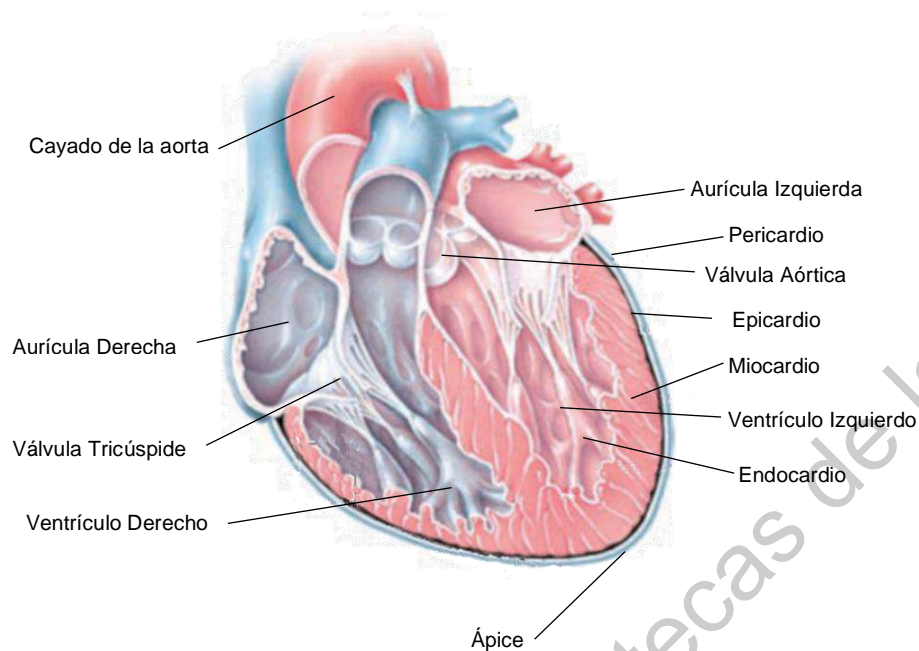


Figura 6.- Vista anterior de la sección frontal del corazón con corte transversal mostrando anatomía interna [68].

IV.4. Perfusión de Corazón Retrogrado de Langendorff

El principio básico del modelo de corazón aislado de Langendorff es mantener la actividad cardíaca, perfundiendo el corazón a través de las arterias coronarias utilizando una cánula aórtica insertada en la aorta ascendente. La solución Krebs (A.8) ingresa al corazón retrogrado a través de la cánula aórtica. Esta solución está constituida por los compuestos mínimos necesarios que simulan el flujo sanguíneo (sales, dextrosa, entre otros). Es importante mencionar que, como el nombre de la técnica lo indica, se hace pasar esta solución de forma inversa al flujo normal de la sangre, lo que significa que la solución de Krebs se introduce por la aorta [71].

La perfusión retrógrada se produce por una presión hidrostática (modelo de presión constante) o por una bomba (modelo de flujo constante) que cierra la válvula aórtica; de esta manera, la solución de perfusión fluye a través de la aorta, al contrario de cómo se lleva a cabo el flujo cardíaco *in vivo*. Con la columna de solución de perfusión dentro de la aorta, la vasculatura de la arteria coronaria se llena a través de dos estructuras conocidas como ostios coronarios (izquierda y derecha) [58,60].

Esta presión se denomina presión de perfusión (PP), la cual puede ser interpretada como la presión dentro de los vasos coronarios.

Debido a que las MNP y CSMNP tienen propiedades magnéticas que las hacen un material único y versátil para la liberación de fármacos o incluso actuar como un principio activo para el tratamiento de enfermedades como el cáncer y la vía de administración es el sistema circulatorio entrando en contacto con el torrente sanguíneo, teniendo como tejido final el miocardio, se eligió el corazón como órgano diana para comprobar los efectos que puedan presentar las nanopartículas en su recorrido a su objetivo final.

IV.5. Sustancias Vasoactivas

Un componente importante en la regulación de la contracción del músculo liso presente en el sistema vascular es el calcio, cuya fuente puede obtenerse dentro de la célula como fuera de ella, o provenir de ambas. Dentro del músculo estriado, el calcio regula la contracción limitando la disponibilidad de actina, mientras que en el músculo liso el calcio limita la presencia de miosina de cadena ligera (MLC) (**Figura 7**). Para mantener la contracción en el músculo liso las células hacen uso de los canales de calcio tipo L, ya que dada la carga de la membrana celular se mantiene con un potencial negativo, lo cual alterna la activación y desactivación de estos canales, manteniendo al menos algunos canales abiertos en todo momento [74].

Además, existen factores de circulación (citocinas) y difusibles (óxido nítrico, NO) dentro del torrente sanguíneo que actúan como mediadores en receptores en la membrana plasmática para limitar los niveles de calcio, llevando a la relajación en bajas concentraciones [75] o citotóxicos cuando existe un exceso de NO [76].

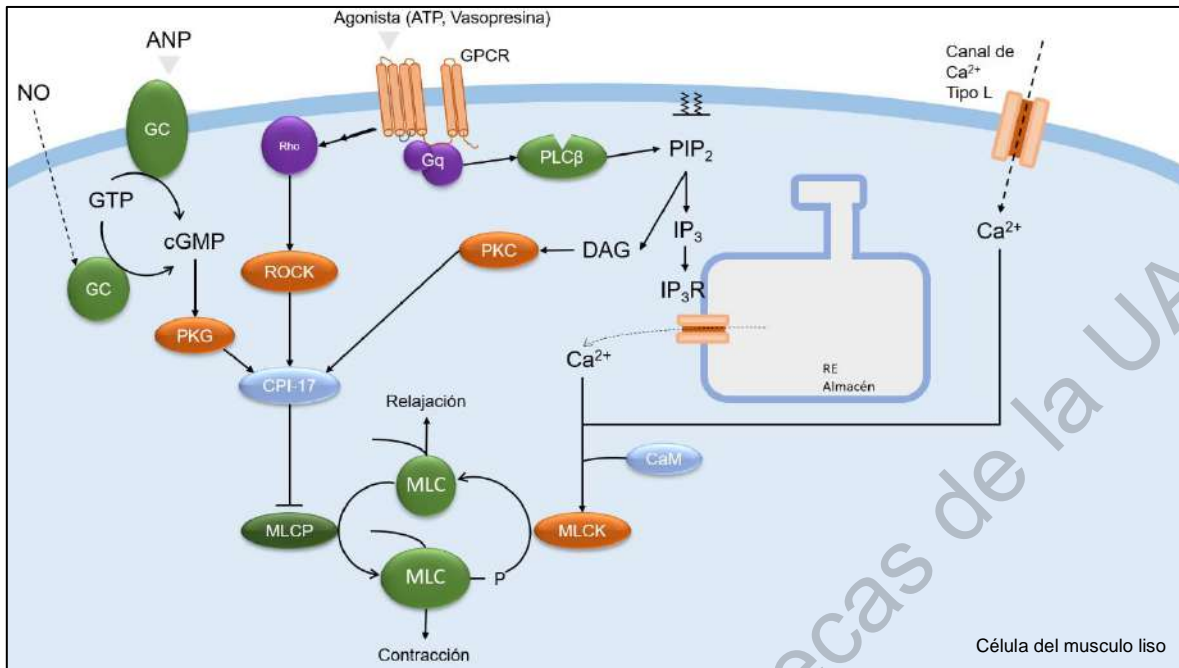


Figura 7.- Diagrama representativo de la contracción del músculo liso [75].

El calcio es una de los elementos más importantes en la regulación de la contracción y relajación del músculo liso, sin embargo, existen sustancias que ayudan a iniciar estas vías de señalización, conocidas como sustancias vasoactivas [77] que regulan la liberación de calcio dentro de las células musculares para iniciar la contracción o relajación de este. Una de las principales sustancias es la acetilcolina, la cual está mediada por la activación de los receptores muscarínicos [78]. Esta activación de los receptores inicia la liberación de calcio contenido en las células (**Figura 8**), lo que aumenta la concentración interna de calcio libre y provoca la apertura de los canales de potasio activados por calcio [74], la apertura de estos canales producen que la membrana celular se despolarice, aumentando el cambio de potencial y la relajación en todo el músculo [79]. Debido a que la hemoglobina juega un papel importante en la regulación del NO, ya que tiene el potencial para inhibirlo y de aumentar la presión arterial sistémica mientras reduce los vasopresores y necesidades de ventilación [80], es importante tener en cuenta las propiedades e interacción que materiales conformados por iones Fe^{2+} , como lo es el caso de la magnetita.

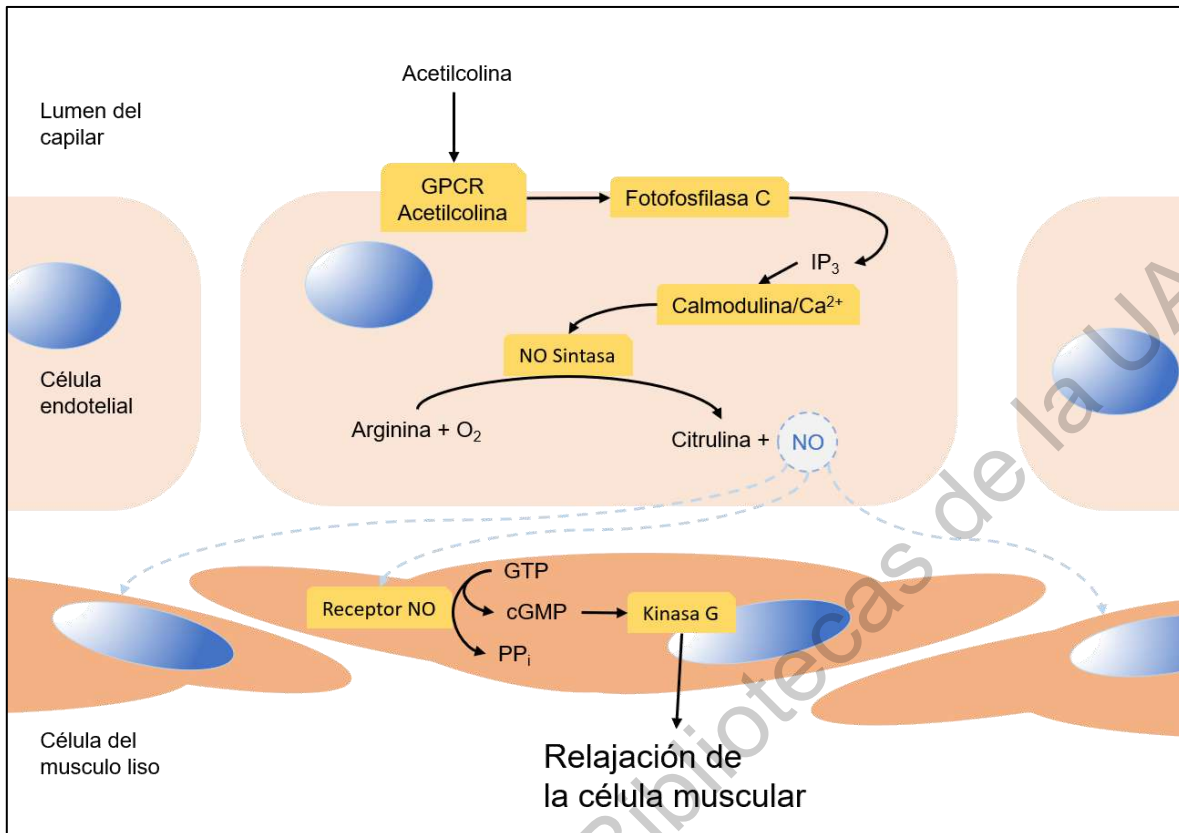


Figura 8.- Diagrama representativo del efecto de la acetilcolina dentro del músculo liso. NO, óxido nítrico; GTP, guanintrifosfato; PP_i, pirofosfato inorgánico; IP₃, inositol trifosfato [68].

Por otro lado, la contracción muscular es iniciada mediante los receptores adrenérgicos correspondientes a la norepinefrina, un agente contráctil sintético similar a la noradrenalina [81]. Esta sustancia es liberada hacia los músculos y es reconocida por una serie de proteínas receptoras denominadas receptores adrenérgicos β , los cuales desencadenan una serie de señales mediante la proteína G activando la enzima adenilil ciclasa para convertir el ATP en AMP que producen la contracción del músculo cardíaco al fosforilar la miosina de cadena ligera (**Figura 7** y **Figura 9**), despolarizando los canales de calcio voltaje-dependientes [82]. Estos efectos se logran también en altas dosis de potasio en las células creando el mismo efecto, una despolarización en los canales de calcio tipo L creado la contracción en el músculo liso [83].

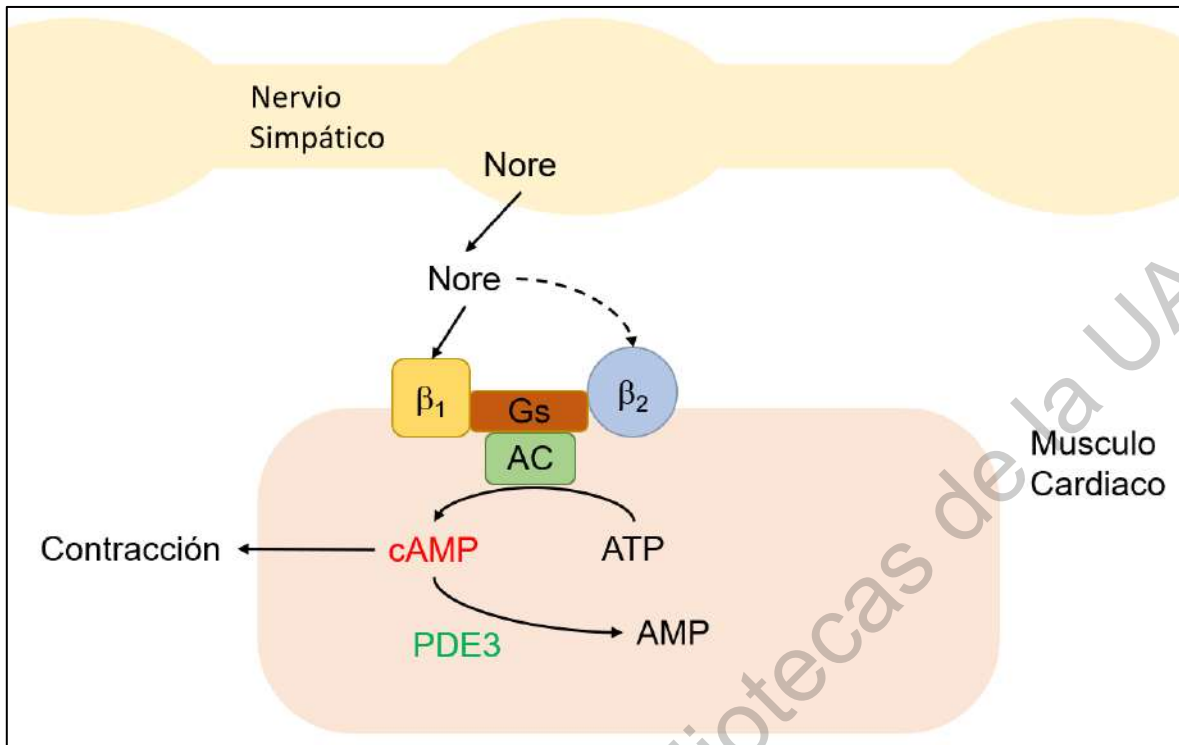


Figura 9.- Diagrama representativo del efecto de la norepinefrina y el efecto contráctil. Nore, norepinefrina; Gs, proteína; AC, adenilil ciclasa; PDE3, fosfodiesterasa cAMP-dependiente tipo 3; β_1 y β_2 , receptores adrenérgicos beta [68].

IV.6. Solubilidad y toxicidad

El hierro es un elemento abundante y un componente esencial para los organismos vivos [84]. El hierro forma óxidos fácilmente al entrar en contacto con el oxígeno, que son altamente insolubles, y por lo tanto no está fácilmente disponible para su absorción por los organismos [85] como lo es la magnetita (Fe_3O_4). A través del tiempo y la evolución, los organismos vivos han desarrollado diversas formas de convertir el hierro en algo útil; algunos microorganismos, como las levaduras, emplean mecanismos para reducir las formas del hierro férrico insoluble (Fe^{+3}) a la forma ferrosa soluble (Fe^{+2}) [86]. Muchos de los mecanismos que se encuentran en organismos inferiores tienen contrapartidas análogas en organismos superiores, incluidos los humanos (**Figura 10**). En el cuerpo humano, el hierro se une y transporta al cuerpo a través de la transferrina y se almacena en las moléculas de ferritina en el hígado y el corazón y una vez absorbido, no existe un mecanismo fisiológico para la excreción del exceso de hierro del cuerpo que no sea la pérdida de sangre [87].

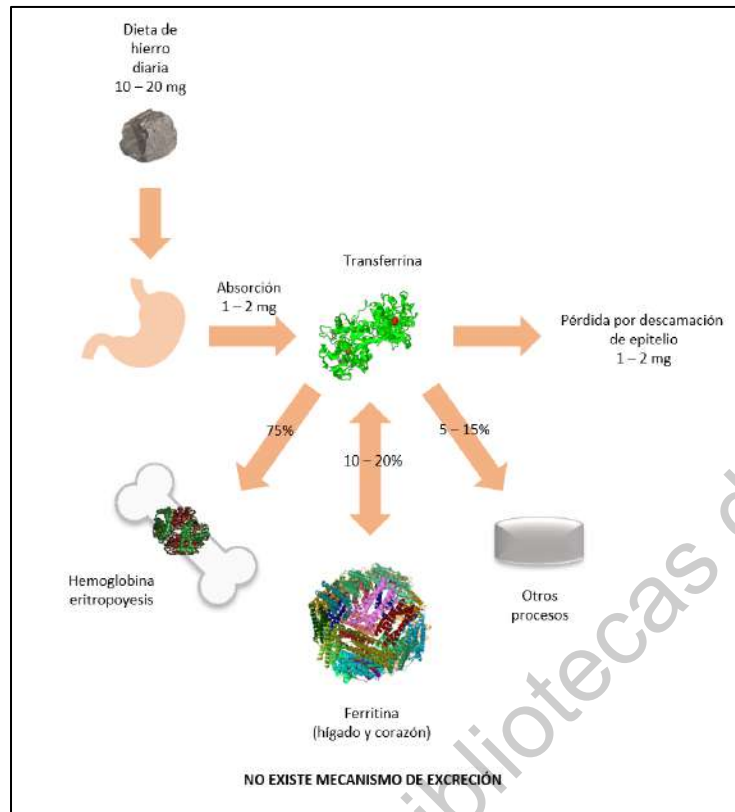


Figura 10.- Diagrama general representativo del papel que desempeña el hierro dentro del organismo [87].

CAPITULO V

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

V. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La constante exposición del tejido miocárdico a diferentes concentraciones de nanopartículas de $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ y $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ podría causar diversos efectos (benéficos o adversos) a nivel histológico o fisiológico dentro del tejido del corazón, aportando valores que serán usados como parámetros de seguridad mediante la técnica de perfusión retrógrada de corazón de rata Langendorff.

Objetivo General

Evaluar el efecto cardiovascular de distintos materiales nanoestructurados ($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ y $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$), haciendo uso de corazones aislados y perfundidos de rata.

Objetivos Específicos

- Realizar la síntesis de las diferentes nanopartículas de $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ mediante el proceso de coprecipitación química y $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ recubriéndolas a través del método de Stöber.
- Obtener la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas a través de las diferentes técnicas de caracterización microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS), microscopía electrónica de transmisión (TEM), potencial Zeta, histéresis magnética, balanza de Curie, difracción de rayos X (XRD), y espectroscopía Raman.
- Analizar posibles alteraciones en los parámetros fisiológicos arrojados en la preparación de Langendorff derivadas de la exposición a materiales nanoestructurados ($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ y $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$).
- Evaluar los efectos fisiológicos inducidos por las nanopartículas de $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ y $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ a partir de los registros de presión de perfusión y producción de NO obtenidos a través de la técnica de Langendorff de perfusión de corazón aislado de rata.

CAPITULO VI

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

VI. Metodología

VI.1. Síntesis de los Materiales

VI.1.1. Síntesis de MNP

Las soluciones precursoras se preparan de Cloruro Férrico (0,5 M) y Sulfato Ferroso (0,5 M) por separado para posteriormente combinarse en el baño ultrasónico BRANSON 1510 con condiciones operativas de 47 kHz en un lapso de 15 minutos en presencia de una atmósfera inerte (N_2). Una vez completado el periodo, se añaden 10 ml de una solución con Hidróxido de Amonio 30%v/v a la mezcla con goteo preciso y controlado en presencia de las mismas condiciones sonoquímicas mencionadas anteriormente durante otros 15 minutos. Una vez concluido el proceso sonoquímico, la neutralización se lleva a cabo lavando la mezcla con etanol hasta alcanzar un pH neutro. El excedente se elimina luego mediante un proceso de calcinación a 50°C durante 4 horas [54].

VI.1.2. Síntesis de CSMNP

Se dispersan 0.1 g de MNP en una mezcla de 80 ml de etanol, 10 ml de agua desionizada y 4 ml de Hidróxido de Amonio (30%) en la cámara sonoquímica a las mismas condiciones (47 kHz) durante 15 minutos. Después del proceso de dispersión, la mezcla de MNP se agrega a una solución de TEOS de 24 ml (1% en peso) previamente preparada y asistida con sonoquímica durante 20 minutos. Posteriormente, la solución obtenida de $Fe^{2+}Fe^{3+}_2O_4/SiO_2$ (CSMNP) se vierte en una placa de Petri y se calcina durante 12 horas a 50°C (**Figura 11**) [88].

La caracterización de las nanopartículas se realizó mediante las técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS), microscopía electrónica de transmisión (TEM), potencial Zeta, histéresis magnética, balanza de Curie, difracción de rayos X (XRD), y espectroscopía Raman para así determinar su morfología, tamaño, estabilidad, magnetización, temperatura de Curie, cristalinidad y estructura.

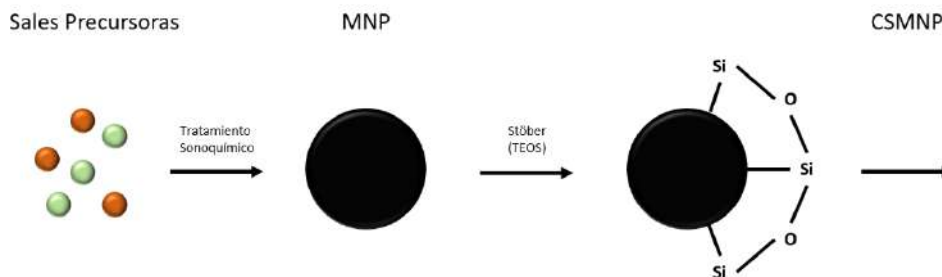


Figura 11.- Esquema en representación de la síntesis de las partículas MNP y CSMNP.

VI.2. Caracterización Físicoquímica

La caracterización de las nanopartículas MNP y CSMNP se obtuvo a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) y la composición elemental se obtuvieron usando un *EDS Brüker QUANTAX S-5500*. La estructura se analizó mediante microscopía de transmisión (TEM) en un microscopio *JOEL JEM 2000FX*. La estabilidad de la partícula se determinó mediante potencial Zeta (PZ) utilizando un *ZETASIZER ULTRA MADLS*. La susceptibilidad magnética se obtuvo a partir de un medidor de susceptibilidad magnética *BARTINGTON MS2* y un equipo *MICROMAG 2900 MAGNETOMETER*. La difracción de rayos X por polvo fino (XRD) con un difractómetro *BRÜKER D8 ADVANCE*, radiación de $\text{Cu}_{\text{K}\alpha}$ con una longitud de onda de 0.15405 nm dentro de un rango de 2θ de 10-100°. Los espectros Raman se obtuvieron con el espectrómetro *LabRAM HR HORIBA SCIENTIFIC* con un láser Nd-YGA ($\lambda = 532 \text{ nm}$).

VI.3. Abordajes Biológicos

VI.3.1. Unidades Experimentales

Ratas macho de la cepa Wistar (250-300 g) se alojaron dos por jaula bajo un ritmo circadiano de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con agua y comida *at libitum*. Posteriormente se sacrificaron por resección del corazón una vez alcanzada la sedación profunda con pentobarbital sódico (50 mgkg^{-1} , intraperitoneal) de conformidad con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 basada en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud [89] aprobado por consejo de bioética y posgrado por parte de la Universidad

Autónoma de Querétaro (Núm. Registro: 004-2019 CEAIFI-196-2018-TP). Posterior al sacrificio, se realizó la disposición del corazón para ser evaluado a través de la preparación del corazón aislado y perfundido de Langendorff.

VI.3.2. Preparación del corazón aislado y perfundido de Langendorff

La perfusión retrógrada de corazón de rata (**Figura 12**) *ex vivo* se realizó con una velocidad de flujo constante [90], [91]. Bajo el efecto de la anestesia con pentobarbital sódico (50 mgkg^{-1} , IP), el corazón se extirpó rápidamente y fue transferido a una solución de **Krebs** 4°C que contenía (mM): NaCl 117.8, NaHCO_3 24.2, KCl 6.0, MgSO_4 1.2, NaH_2PO_4 1.2, Glucosa 5.0, CaCl_2 1.75 y Piruvato 5.0. Luego, el corazón se conectó a una cánula aórtica del aparato de Langendorff y se perfundió a flujo constante (8 mLmin^{-1}) con solución de Krebs en presencia de burbujeo constante de Carbógeno (95% de O_2 y 5% de CO_2) a 37°C . La presión de perfusión (PP), considerada como un índice de tono vascular coronario se obtuvo mediante el uso de un transductor conectado al equipo arriba de la cánula aórtica. Se colocaron dos electrodos en la aurícula y el ápice derechos para mantener la frecuencia cardíaca a 4.5 latidos por segundo. Los parámetros fisiológicos se adquirieron y analizaron utilizando el software HA – HSE ISOHEART W de Harvard Apparatus (Holliston, MA, EE. UU.).

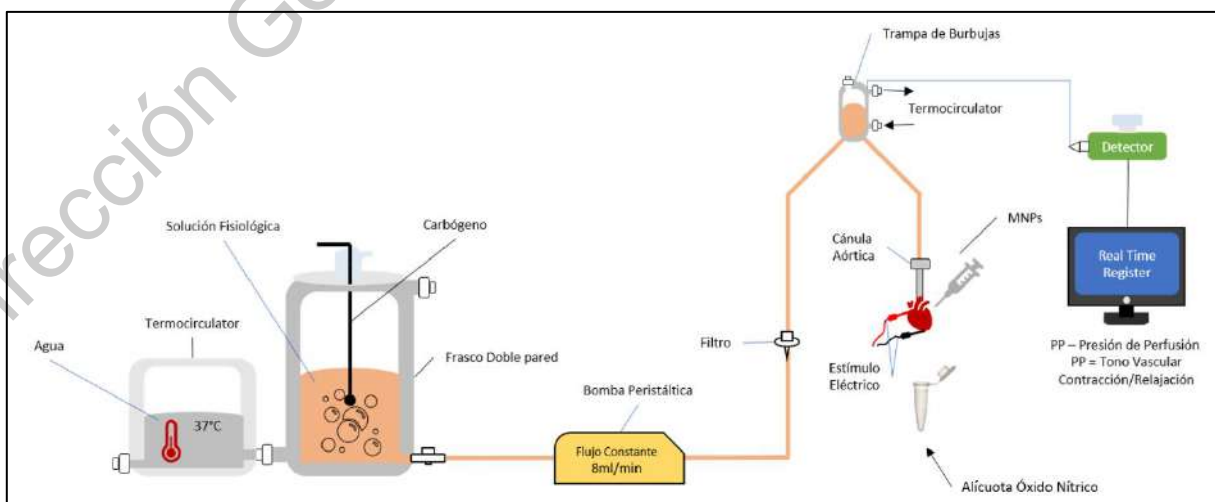


Figura 12.- Esquema del equipo Langendorff.

VI.3.3. Tratamientos

Una vez puesto en marcha el sistema de Langendorff, el corazón se mantuvo durante 20 min en una primera fase de estabilización previa a la administración de las diferentes concentraciones de nanopartículas a analizar (1, 10, 100, 1000 mgmL^{-1}). Para corroborar la funcionalidad del corazón, se perfundieron Norepinefrina (Nore) y Acetilcolina (ACh) ambos administrados a concentración de $10\mu\text{M}$ al principio y al final de cada experimento como agentes contráctil y vasodilatador, respectivamente [73]. Se perfundieron concentraciones crecientes (1, 10, 100, 1000 mgmL^{-1}) de $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ (MNP), y $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (CSMNP), en todas las condiciones control y administraciones realizadas se registró la PP como un índice del tono vascular, medido en mmHg. Así mismo, todas las administraciones realizadas fueron inyectadas como bolo con ayuda de una jeringa, se tomaron 8ml y se administró en un intervalo de un minuto, para no interferir con el flujo impuesto por la bomba peristáltica (**Figura 13**).

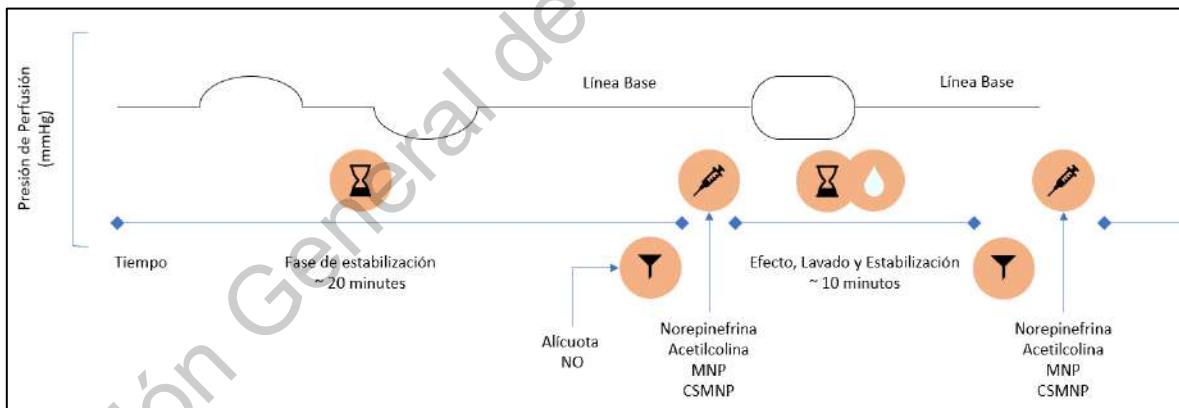


Figura 13.- Representación gráfica del registro obtenido del equipo Langendorff.

VI.3.4. Determinación de Óxido Nítrico (NO)

La cuantificación de NO se determinó indirectamente a través de la formación de nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) [92] utilizando el método de Griess (**Figura 14**), donde se forma un cromóforo como resultado de la diazotación de sulfanilamida por nitrito ácido seguido de acoplamiento de aminas bicíclicas (N-[1-naftil]etilendiamina). Una vez realizada la reacción se determinó la concentración con el equipo iMark BIORAD Microplate Reader a una longitud de onda de 595nm [93].

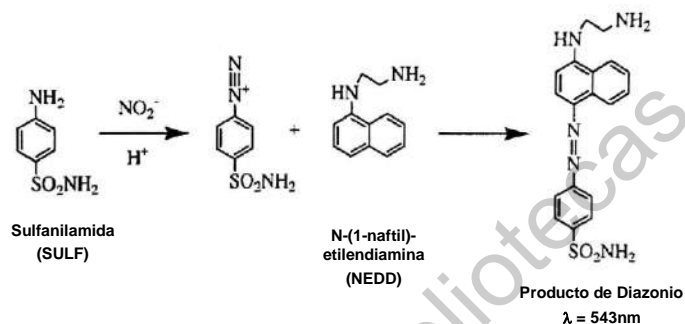


Figura 14.- Reacción de Griess.

CAPITULO VII

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

VII. Resultados y Discusión

VII.1. Caracterización Fisicoquímica de las nanopartículas MNP y CSMNP

De acuerdo con lo observado en el análisis elemental obtenido por medio del EDS, se puede apreciar que sólo el hierro, el silicio y oxígeno están presentes en las muestras, la muestra de con concentraciones de 75.08% en peso de hierro y 24.92% en peso de oxígeno, lo cual es el primer indicativo en la relación Fe/O que el material es magnetita y no maghemita. Una vez aplicado el recubrimiento de silicio, los valores cambiaron a 65.43% en peso de hierro, 26.22% en peso de oxígeno y 8.35% en peso de silicio (**Figura 15**).

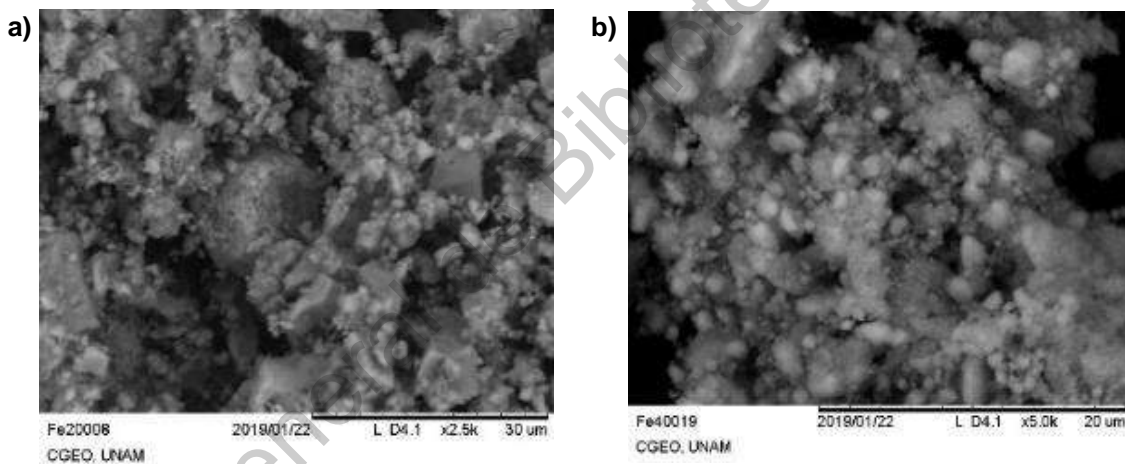


Figura 15.- Imágenes SEM de a) MNP y b) CSMNP sintetizado y el porcentaje de los elementos presentes en el material obtenido del análisis EDS (normalizado).

La **Figura 15** muestra las imágenes obtenidas del SEM y, como se puede observar incluso en polvo, las nanopartículas muestran una pobre dispersión de partículas en general, puesto que la aglomeración de las partículas es inevitable debido a las propiedades magnéticas que estas presentan, formando grandes cúmulos y aglomeraciones. Sin embargo, se pueden apreciar pequeñas partículas dentro de estos grupos, y aunque se logran percibir las nanopartículas, no es posible garantizar que el recubrimiento se base sólo en este análisis. Se realizó el análisis

TEM para obtener el tamaño promedio de partícula, medido en 13.44 nm para las MNP, formando aglomerados de 151.34 nm tamaño promedio, mientras que las CSMNP tienen un tamaño promedio de partícula de 25.72 nm que a su vez forman aglomerados de 255.67 nm, calculados con ayuda de la herramienta de medición de imagen *ImageJ Image Software Analyzer* y *GATAN Digital Micrograph* a partir de las micrografías obtenidas de TEM (**Figura 17**).

Los análisis de las micrografías TEM revelaron un posible indicio sobre el recubrimiento de las nanopartículas Core/Shell dado que, a diferencia de las partículas no recubiertas (**Figura 17a y 13c**) donde se observan grandes cúmulos conformados por partículas de alrededor de 13 nm, se aprecia el recubrimiento de las partículas en las aglomeraciones mostrándose áreas más tenues alrededor de las partículas más oscuras (**Figura 17b y 13d**).

Los análisis de las micrografías SEM parecen presentar las mismas aglomeraciones como estructuras tridimensionales, que pueden ser comparables a las aglomeraciones mostradas en las imágenes TEM, que podrían demostrar el recubrimiento Core/Shell.

Al presentar el material dos estados de oxidación (Fe^{2+} soluble y Fe^{3+} insoluble en agua) la magnetita está libre para oxidación, lo cual genera óxidos de hierro (FeO) y le da la coloración naranja característica de los óxidos de hierro (**Figura 16**) [36]. Aun con la presencia de un campo magnético, la solución no vuelve a su coloración habitual, lo que parece indicar que la formación de óxidos y iones solubles (Fe^{2+}) se presenta, aun cuando las NP se sometieron a recubrimiento de silicio, lo que parece indicar que el recubrimiento no fue homogéneo en todo el material magnético.

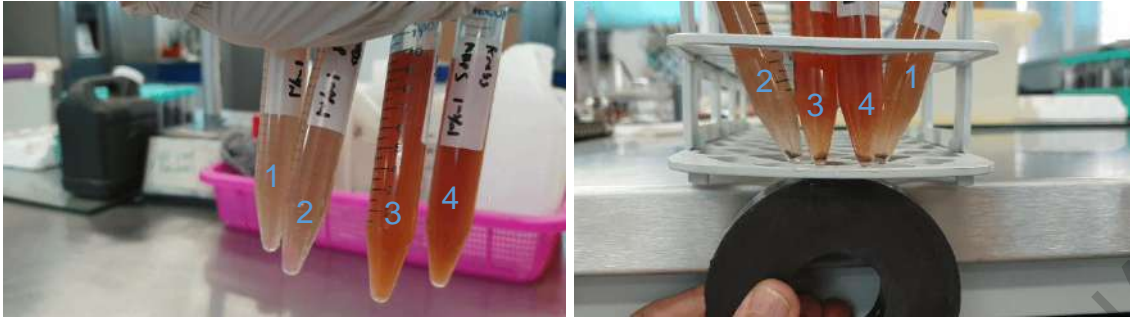


Figura 16.- Soluciones de nanopartículas en agua (1 y 3) y solución fisiológica de Krebs (2 y 4) de las nanopartículas.

De igual manera, se llevaron a cabo análisis TEM de las nanopartículas en solución de **Krebs** ya que las nanopartículas se administraron dentro de los vasos coronarios en solución de iones simulando el flujo sanguíneo para entender los impactos que pueden llegar a tener dentro del tejido del miocardio, descritos posteriormente dentro de este capítulo (**Figura 17b, c, e y f**). En la micrografía de la **Figura 17e** se observa la posible lixiviación del material al entrar en contacto con la solución fisiológica.

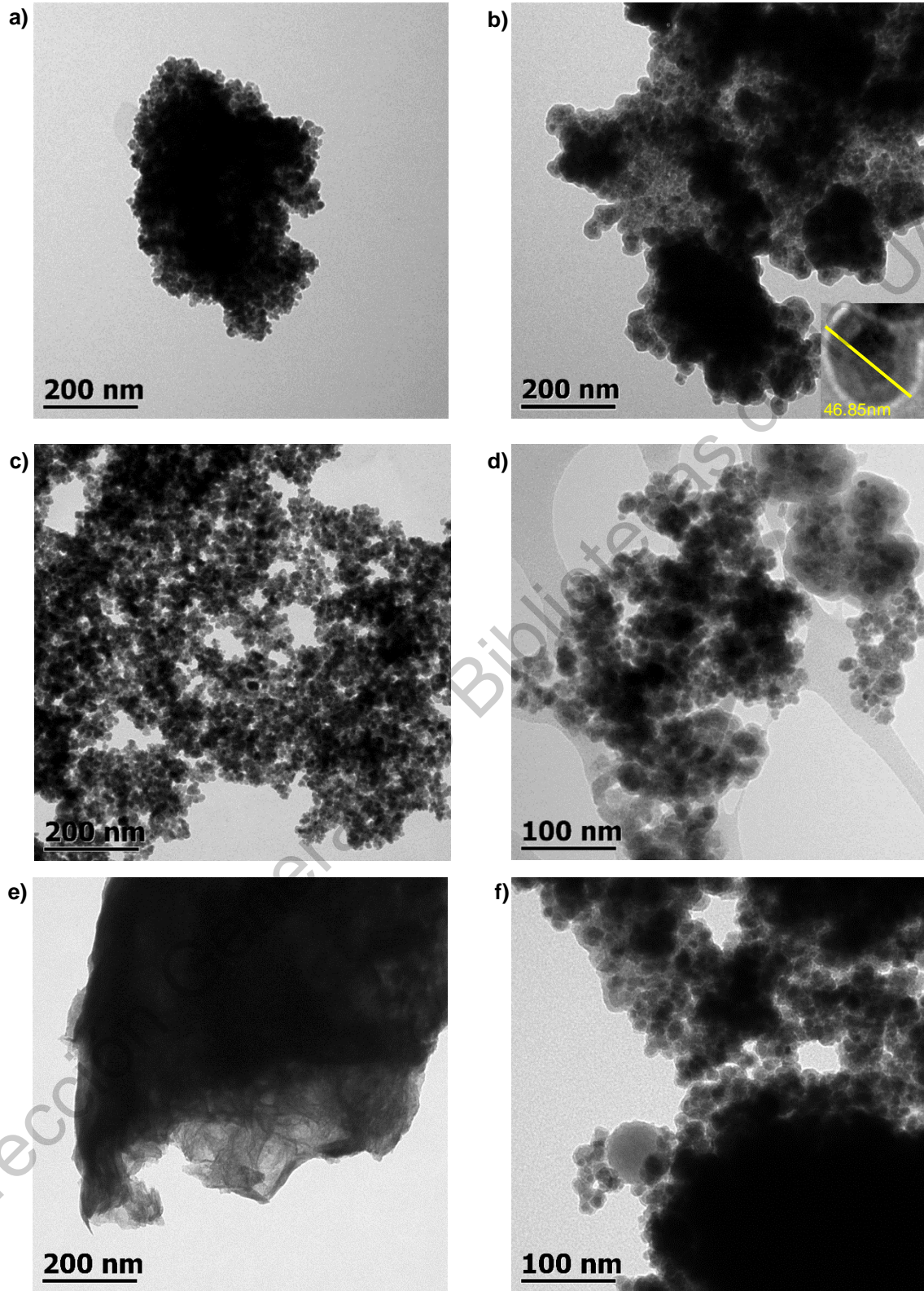


Figura 17.- imágenes TEM de las muestras de MNP a) disueltas en agua y c) y e) en solución fisiológica de Krebs y CSMNP b) disueltas en agua y d) y f) en solución fisiológica de Krebs, respectivamente a una concentración de 0.001 mgmL^{-1} .

La estabilidad de las partículas y su distribución de tamaño fueron determinados mediante la técnica de Potencial Zeta (**Figura 18**). Al presentar un campo magnético, alrededor de $32.05 \text{ Am}^2\text{kg}^{-1}$ de susceptibilidad magnética (M_s), la lectura de las nanopartículas fue improductiva a relativamente altas concentraciones, pero se pudo obtener lectura de las nanopartículas recubiertas en una dilución a 0.001 mgmL^{-1} . Al obtener las lecturas de las MNP se observa un tamaño promedio de partícula en alrededor de 161.8 nm (**Figura 18c**), sin embargo, las MNP presentaron otros tamaños alrededor de 303 y 401 nm en menor porcentaje (5% y 3% , respectivamente). Sin embargo, presentan un potencial con valor de -16.09 mV , lo cual indica que las nanopartículas presentan baja estabilidad [94], [95], por lo que las partículas tienden a formar grandes agregados para alcanzar niveles energéticos menores, observados en las imágenes SEM y TEM (**Figura 15** y **Figura 17**).

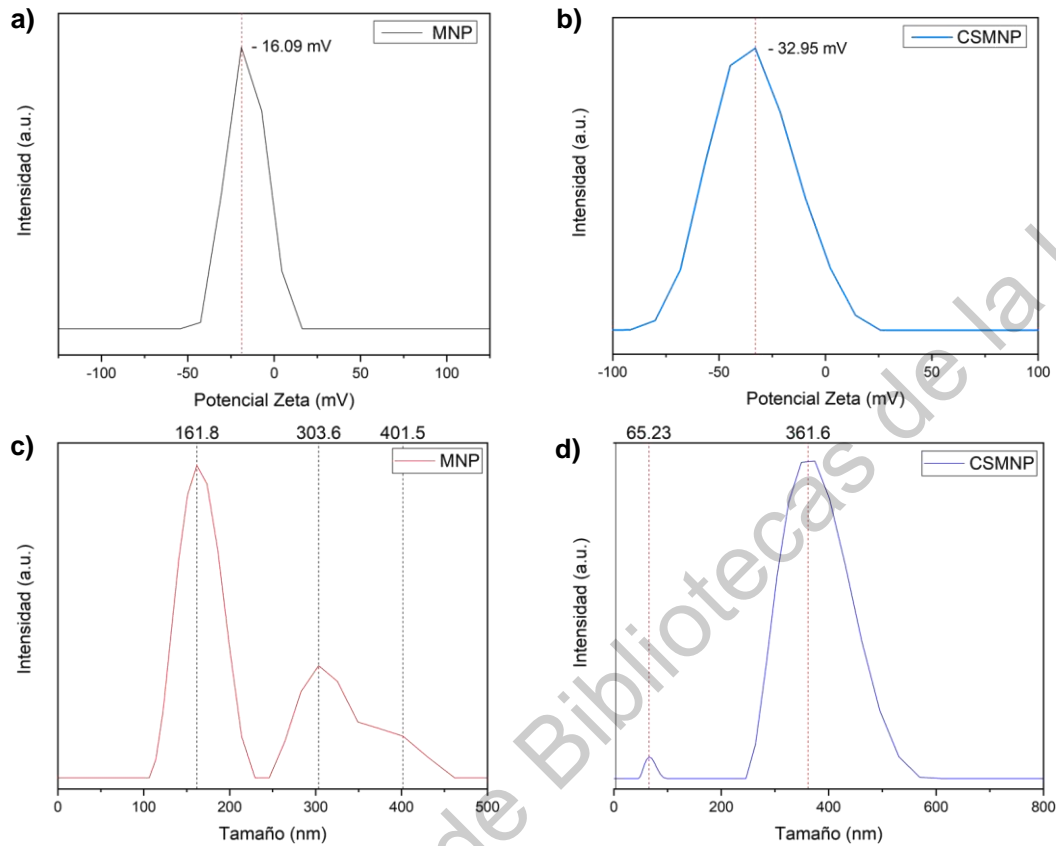


Figura 18.- Curvas de potencial Zeta de a) MNP y b) CSMNP. Distribuciones de tamaño de partícula de c) MNP y d) CSMNP.

Las CSMNP en cambio, presentaron un valor de potencial mayor que las MNP sin el recubrimiento de silicio, incrementándolo hasta -32.95 mV, lo cual sugiere que las nanopartículas fueron cubiertas en mayor parte si no es que en su totalidad por el silicio, debido que la estabilidad de las nanopartículas incremento el doble (>30 mV) y el ancho de la curva indica un incremento en el tamaño de la partícula. Como se observa en los análisis de TEM, el material se aglomera en partículas de mayor tamaño que fueron recubiertas por el silicio, esto puede deberse a que la energía suministrada por el baño ultrasónico no era la suficiente para lograr una buena dispersión [88]. Las partículas alcanzaron un tamaño de ahora 361.6 nm con un aporte del 1% de partículas alrededor de 65.23 nm, lo cual podría indicar que las

partículas MNP no fueron totalmente recubiertas, y se mantuvo una pequeña parte de ellas expuestas.

Como primer enfoque para determinar la estructura cristalina presente en las nanopartículas, se llevó a cabo un análisis XRD. Los difractogramas resultantes (**Figura 19**) se cotejaron contra la base de datos de la American Mineralogist Crystal Structure Database (AMCSD, código 0002400), los cuales muestran las difracciones de Bragg típicos de la estructura de espinela característica de la disposición $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ en las regiones 30.444° , 35.796° , 43.423° , 57.464° y 63.08° que representan los planos (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (5 1 1) y (4 4 0) respectivamente, siendo los más representativos los planos (3 1 1), que pueden predecir que efectivamente hay presencia de magnetita y no maghemita en las nanopartículas [96]–[101].

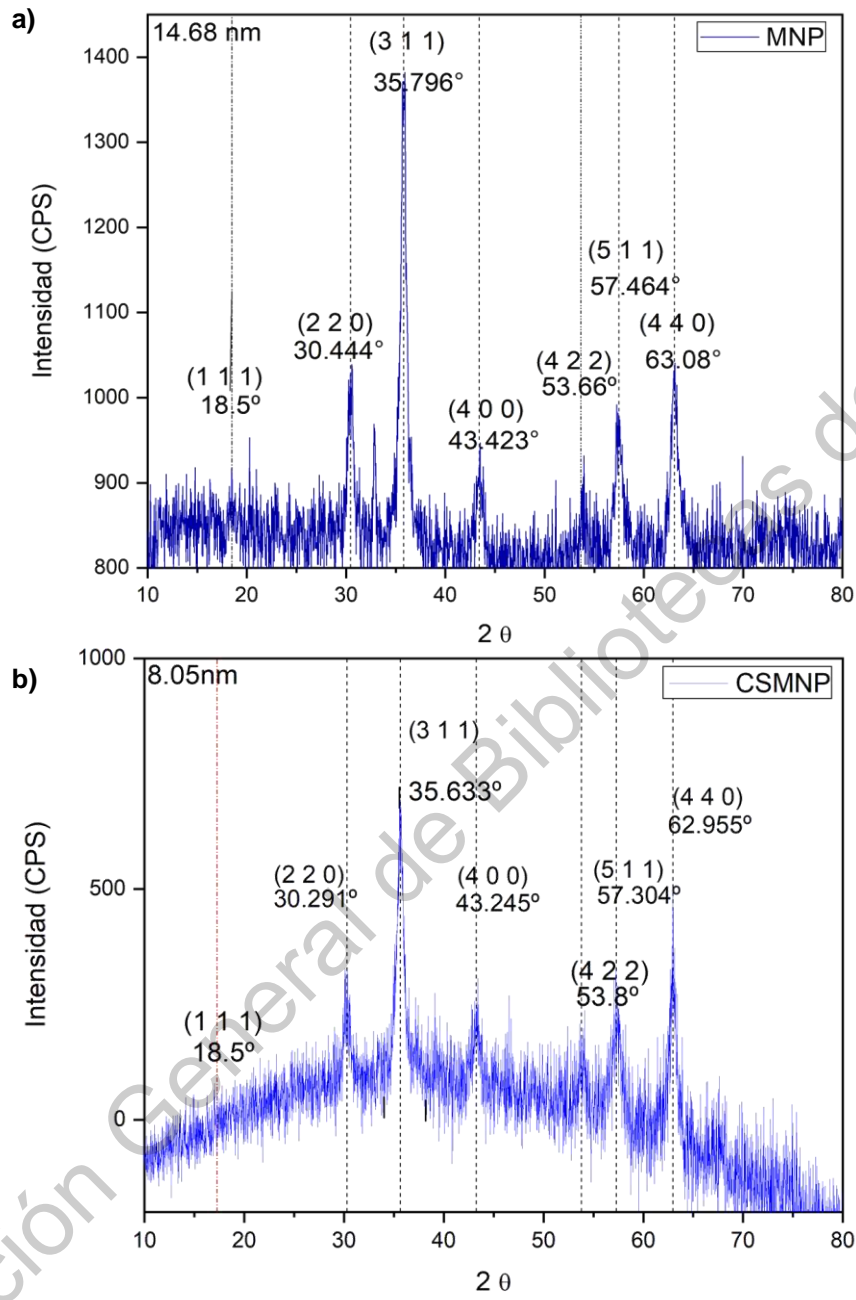


Figura 19.- Espectros XRD de ángulo abierto de a) MNP y b) CSMNP.

Una vez que se aplicó el tratamiento de Stöber, las difracciones de Bragg características que representan la estructura de espinela de Magnetita permanecieron, lo que indica que la estructura no cambió después del recubrimiento. Aunque si existe un desplazamiento de estas difracciones de Bragg hacia la izquierda, no es lo suficientemente grande para considerarlo representativo, pero da indicio de que la estructura presenta una ligera tensión uniforme dentro de la red cristalina [102]. Además, la línea base cóncava en el difractograma podría atribuirse a la contribución amorfa de la cubierta de silicio. El tamaño del cristalito calculado utilizando la determinación de Williamson - Hall ($D = \frac{0.9\lambda}{\beta_t \cos \theta}$, $\beta_t = \beta_{\text{tamaño}} + \beta_{\text{esfuerzo}}$) a partir de las difracciones de Bragg dio como resultado un cristalito aproximado de 14.68 nm, que podría atribuirse a las condiciones de la síntesis asistida por ultrasonido [54].

Los difractogramas muestran una pobre presencia de calidad cristalina, observada por el ruido de los difractogramas, como se puede esperar debido a la falta de un tratamiento térmico que podría mejorar aún más dicha calidad cristalina debido al crecimiento de grano, aunque esto podría propiciar un entorno preparado para la oxidación [103], capaz de modificar la estructura de la espinela y, por lo tanto, eliminar las propiedades magnéticas de interés al alcanzar la temperatura de Curie.

Análisis adicionales se llevaron a cabo para corroborar la presencia de la estructura de espinela de magnetita, lo cual podemos observar en los espectros Raman (**Figura 20**, donde los recuadros representan los espectros panorámicos) donde los números de onda en 306 - 310 , 450 - 490, 538 - 554 y 668 - 672 cm^{-1} [104], son las vibraciones correspondientes para el E_g , T_{2g} , T_{2g} y A_{1g} respectivamente, ligados a los reportados en la literatura [105] referibles a las vibraciones moleculares de la estructura espinela-magnetita. En la **Figura 20a y 20b** se observan las señales de los nodos vibracionales anchos y no definidos, esto parece indicar (junto con los análisis XRD en la **Figura 19**) que la muestra no presenta una buena calidad cristalina, debido a la falta de tratamiento térmico posterior a la síntesis. Este

resultado concuerda con los presentados en los espectros XRD en que podríamos tener la estructura de espinela deseada y con eso, el magnetismo para las aplicaciones en imagenología o focalización en nanomedicina, junto con las propiedades de biotolerancia de la superficie de silicio [106].

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

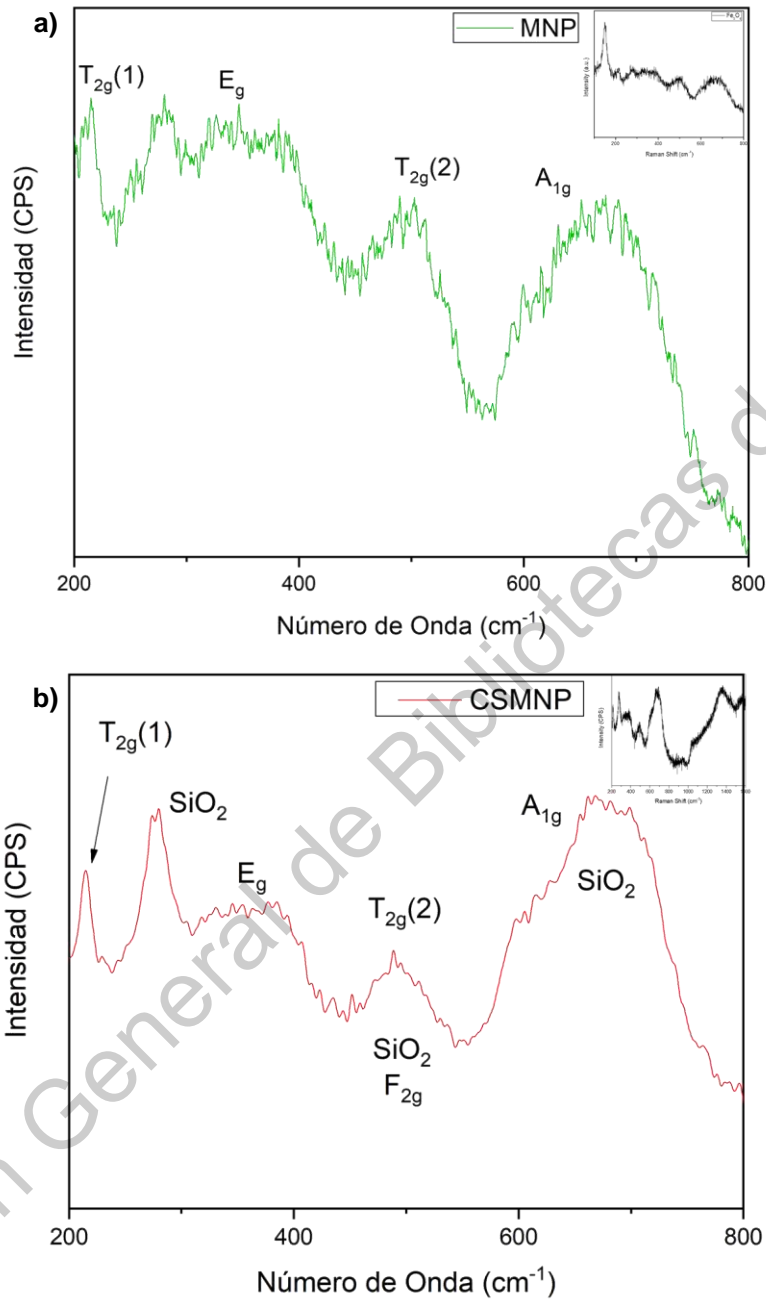


Figura 20.- Espectros Raman de a) MNP y b) CSMNP. Los grupos de simetría representativos se observan para las posiciones atómicas de la magnetita [104] Los recuadros representan al espectro Raman panorámico.

La temperatura de Curie (**Figura 21**), con un valor aproximado de 636.112°C y una curva característica de alta oxidación cuando se somete a campo magnético [107], [108]. Las nanopartículas recubiertas no fueron analizadas debido a que el análisis se realiza con un material no magnético (fibra de vidrio) separando el material magnético, justo como el recubrimiento de silicio.

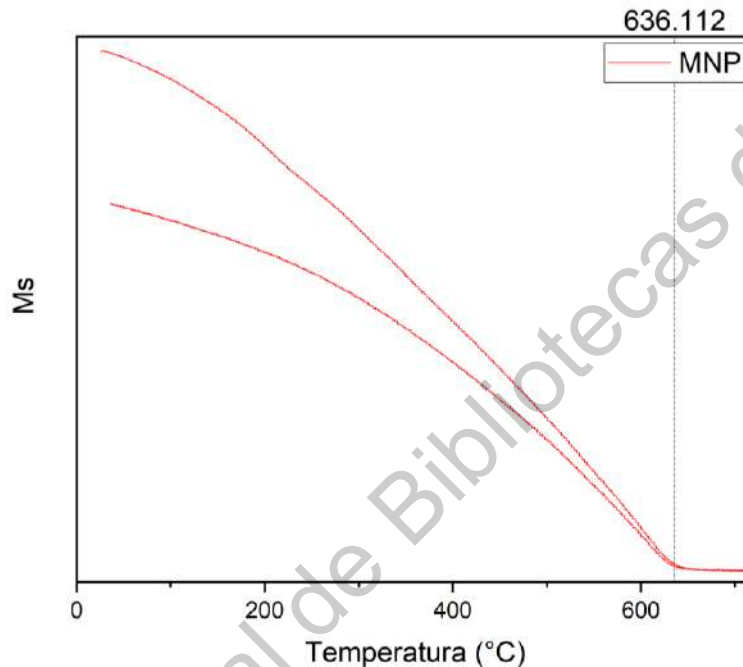


Figura 21.- Análisis obtenido de la histéresis de la balanza de Curie para las partículas magnéticas.

Las MNP se sometieron a caracterización magnética mediante la presencia de diferentes campos magnéticos y frecuencias. Las curvas de magnetización de las MNP y CSMNP revelaron que en la saturación de magnetización de las muestras se logran distinguir dos valores en la saturación M_s , uno inicial en 24.75 y 32.05 $\text{Am}^2\text{kg}^{-1}$ (para MNP y CSMNP respectivamente) con un incremento debido a la aportación de partículas de mayor tamaño en 62.36 y 35.41 $\text{Am}^2\text{kg}^{-1}$ respectivamente. En la **Figura 22a** se observa que la curva de histéresis presenta un aumento en la magnetización antes de su punto de saturación M_s , lo cual indica una aportación de mayor magnitud de las partículas superparamagnéticas más pequeñas [109].

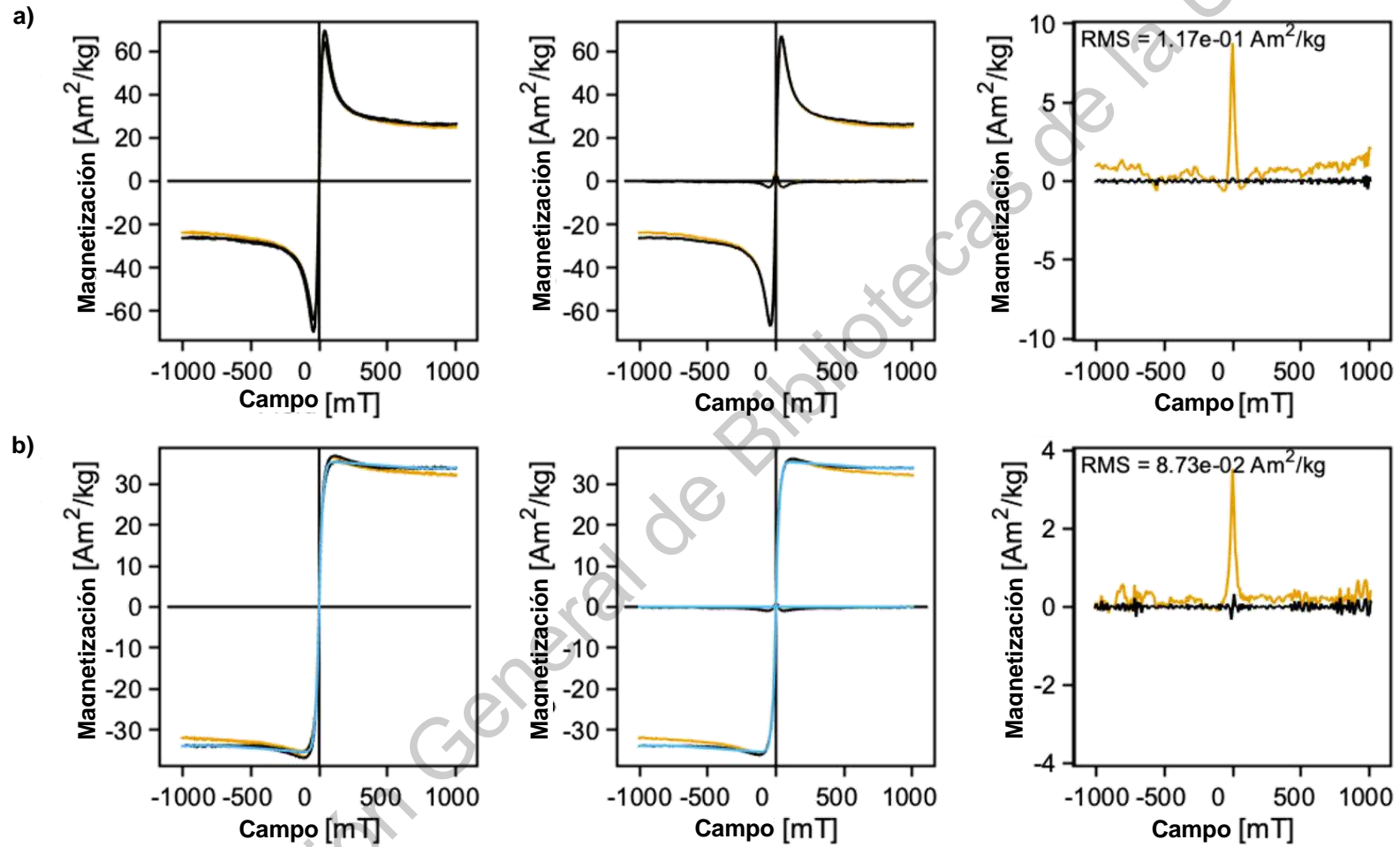


Figura 22.- Curvas de magnetización y análisis de histéresis magnética de a) MNP y b) CSMNP.

Un análisis más exhaustivo es necesario para asegurar un recubrimiento tridimensional completo de las partículas, puesto que a simple vista y en presencia de un campo magnético, la solución exhibe una coloración característica de los iones de hierro, lo cual indica que el material está presentando lixiviación de iones Fe^{2+} , los cuales son solubles en agua. Sin embargo, los análisis SEM, TEM y PZ aportan evidencia complementaria sobre el recubrimiento de las nanopartículas, aunque parcial, sin mencionar las diferencias presentadas en los ensayos biológicos a continuación.

VII.2. Pruebas Biológicas

Los iones presentes en la solución de Krebs parecen tener un impacto en la dispersión de las MNP [110], donde se aprecia un mayor espaciamiento (**Figura 17c y 17b**) a bajas concentraciones (0.001 mgmL^{-1}) dispersadas bajo las mismas condiciones de sonoquímica que las MNP suspendidas en agua, lo cual podría causar múltiples laceraciones en el tejido, o pasar a través del tejido sin provocar modificación alguna en éste.

VII.2.1. Análisis de Concentraciones Acumulativas

Dado que cada corazón es diferente, no puede ser estandarizado un control como tal, en este caso se tomó a cada corazón como su propio control posterior a la administración de las nanopartículas para asegurar que la respuesta que se reciba del corazón sea adecuada. Para la técnica de Langendorff se obtuvo un patrón de registro, se le da un período de estabilización de veinte minutos al corazón para asegurar la presión constante o línea base (baseline) antes de comenzar la administración de reactivos. Una vez alcanzado este período, se administraron al corazón aislado y perfundido las sustancias vasoactivas control; respuesta contráctil inducida por Nore y respuesta relajante inducida por ACh del corazón. Posterior a eso se dio un período de estabilización de diez minutos para permitir el lavado de las sustancias y una administración posterior de los tratamientos, con un período de estabilización de diez minutos entre ellas. La ACh indujo un efecto relajante dentro

del corazón, evidenciado por un decremento en la PP, mientras que la Nore induce un efecto contráctil, visto como un incremento en la PP (**Figura 23a**).

Los registros representativos (**Figura 23**) presentados en este documento se obtuvieron tras analizar los datos estadísticos obtenidos del equipo de Langendorff después de tres experimentos (**Figura 24a y 24c**).

Las nanopartículas de MNP indujeron un efecto dual de relajación-contracción en el rango de concentraciones de 0.001, 0.01, 1 mgmL⁻¹ (**Figura 23b**), un efecto de aparente relajación transcurridos pocos segundos después de la administración, seguido de un efecto contráctil sostenido con un importante incremento en la PP, dado que al administrar las partículas de forma consecutiva, pudieran aumentar de tamaño debido al incremento de las concentraciones [24]. Este incremento conlleva un efecto visible en el corazón, donde aumenta de tamaño y su coloración cambia a un color tenue. Sin embargo, la contractura del tejido cardiaco y alteración fisiológica que presentó el corazón sugieren una cardiomiopatía hipertrófica y dilatada, en la que se produce un hinchamiento de las cámaras de bombeo del corazón, en especial la cámara principal (ventrículo izquierdo) [111]. Aunque la posibilidad de un infarto no es viable, dado que el corazón no presentó signos visibles de infarto, así como las MNP (del orden de 160 nm) no podrían obstruir un vaso coronario, que es de alrededor de 260 µm de espesor, con algunos pequeños de 100 µm [70].

Las MNP indujeron un efecto visible en el corazón, empezando con la concentración más baja (0.001 mgmL⁻¹) elevando la PP hasta un 189% con respecto a la presión base, seguido de un aumento con la segunda concentración (0.01 mgmL⁻¹) alcanzando un 240% aproximadamente. Al aplicar las últimas dos concentraciones la PP se elevó hasta un 386% sobre la línea base, aplicando una gran presión sobre el corazón (212 mmHg aproximadamente).

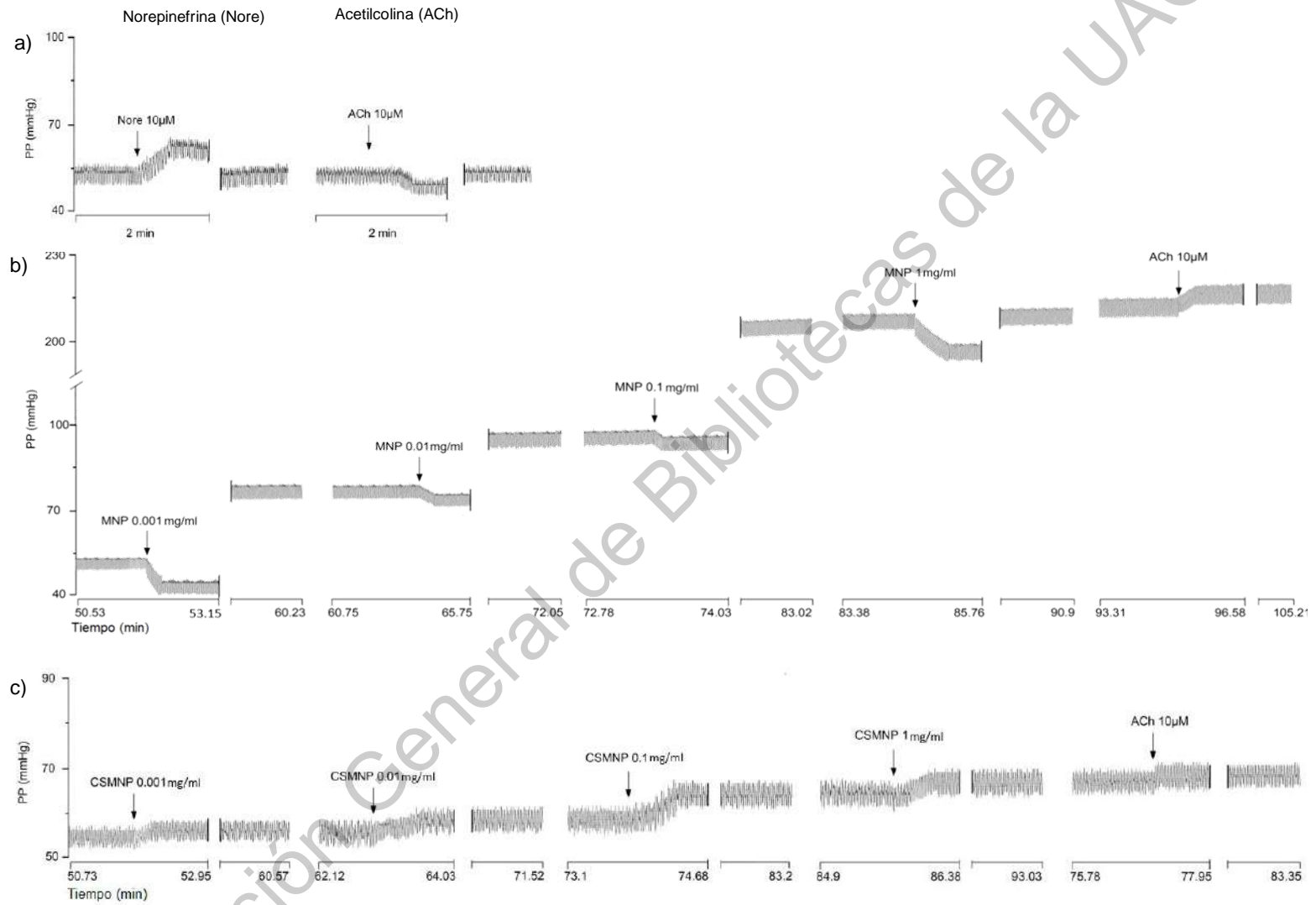
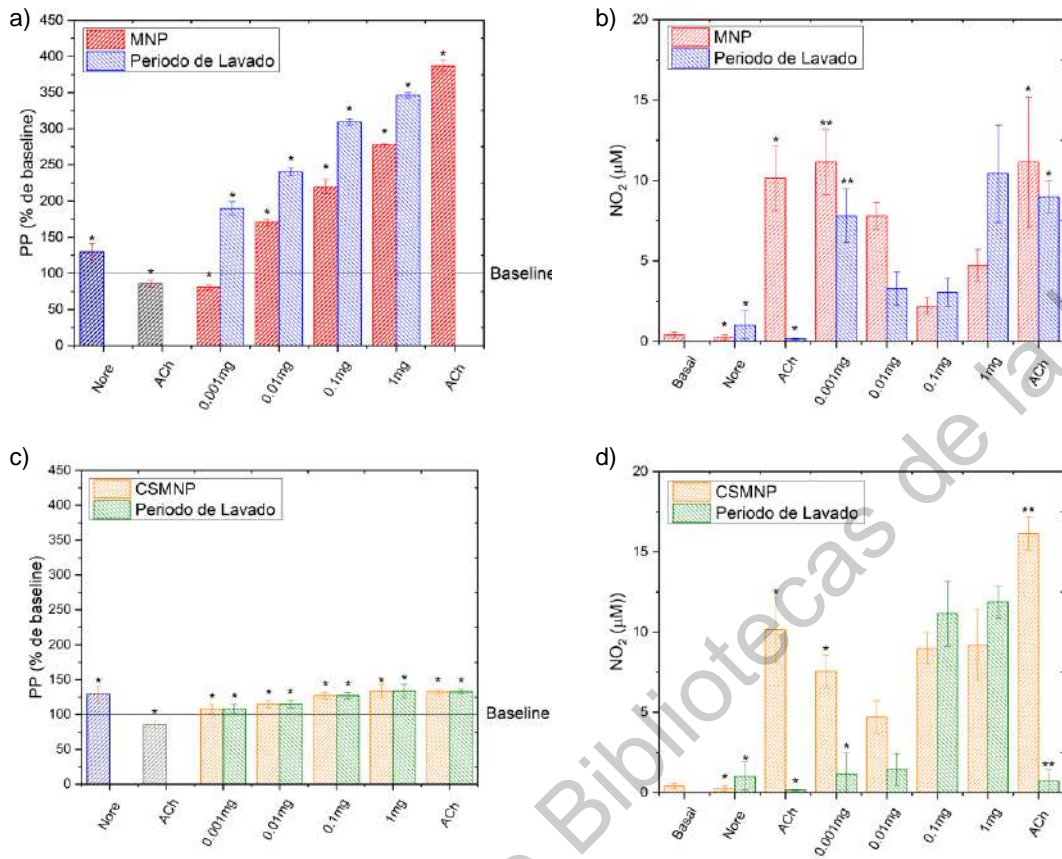


Figura 23.- Registros representativos de los controles aplicados (a) sustancias vasoactivas y las concentraciones crecientes de MNP (b) y CSMNP (c) en corazones perfundidos de rata.

Una vez que termina la administración de todas las concentraciones de las MNP, se procedió a realizar la administración de ACh al final para contrarrestar la contractura que sufrió el corazón; sin embargo, se encontró que el efecto relajante de la ACh se ve afectado por las nanopartículas, evidenciado por un bloqueo del efecto de relajación generado por la ACh, en otras palabras, la ACh presentó un efecto contráctil en el miocardio, debido a la interferencia de los iones Fe^{2+} [80]. En paralelo, se realizó la determinación de la producción de NO bajo este perfil de administración (**Figura 24c y 24d**), observando un incremento significativo en la concentración de producción de NO, alrededor de $12\mu M$ referente al control (solución fisiológica) y $2\mu M$ al control en presencia de ACh, sugiriendo el desarrollo de un proceso inflamatorio en el tejido de estudio, posiblemente derivado de la estimulación de la isoforma inducible de la producción de NO [112], o bien a través del bloqueo de los receptores muscarínicos, quienes tienen afinidad por la ACh [113].

Dadas las propiedades magnéticas de las nanopartículas y su reducido tamaño, se podría sugerir que éstas forman un agregado con los iones presentes dentro de la solución de Krebs [114], limitando al corazón de estos y provocando así los efectos de aparente relajación y la posterior elevación de la presión. Junto con la lixiviación de iones Fe^{2+} que se producen al estar presente el material en la solución de Krebs [85] podrían estar interfiriendo con los productos de NO generados como respuesta del corazón en presencia de las MNP, que se ha reportado los compuestos tipo Fe^{2+} como la hemoglobina tienden a ser inhibidores en la señalización de NO [80]. De la misma forma, las CSMNP presentan el mismo comportamiento, dado que no se logró el recubrimiento total de las MNP, apreciado en el color naranja de la **Figura 16**.



Las nanopartículas CSMNP inducen efectos contráctiles del orden de 108% contra la línea base, sostenidos en los vasos coronarios en el rango de concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1, 1 mgmL⁻¹, pero es en menor magnitud que los efectos contráctiles de las MNP (189%). Una vez que se realizó la administración de ACh al final de la administración de todas las concentraciones, se encontró que existe, al igual que con las MNP, un bloqueo del efecto de relajación generado por la ACh (**Figura 23c**) y un efecto contráctil [115]. De forma semejante, al realizar la determinación de NO se encontró un aumento en los niveles del mediador [116], incluyendo a la ACh, lo que sugiere de nuevo que las nanopartículas podrían estar interfiriendo en el metabolismo de NO [113], o dañando los receptores muscarínicos asociados a la respuesta de relajación del músculo liso [112] debido a la liberación

de iones Fe^{2+} al igual que los efectos presentados en los análisis de concentraciones acumulativas, lo que podría explicar el efecto contráctil del NO, junto con su toxicidad en concentraciones altas [76].

Este efecto menor sostenido del 108% en las CSMNP a diferencia del 189% de las MNP puede deberse a la cubierta de silicio, que eleva la tolerancia en el organismo, pero no los efectos de tamaño [34], junto con la menor presencia de iones solubles de hierro Fe^{2+} , lo que podría explicar el incremento en la PP y una evidencia del recubrimiento parcial de las partículas.

VII.2.2. Análisis de Concentraciones Individuales

Una vez realizadas las pruebas de concentraciones continuas, se procedió a realizar pruebas con una concentración única en un sólo corazón para determinar si los efectos podrían ser derivados de una sola concentración, o de un efecto acumulativo de las concentraciones administradas de MNP y CSMNP (**Figura 25** y **Figura 26** respectivamente).

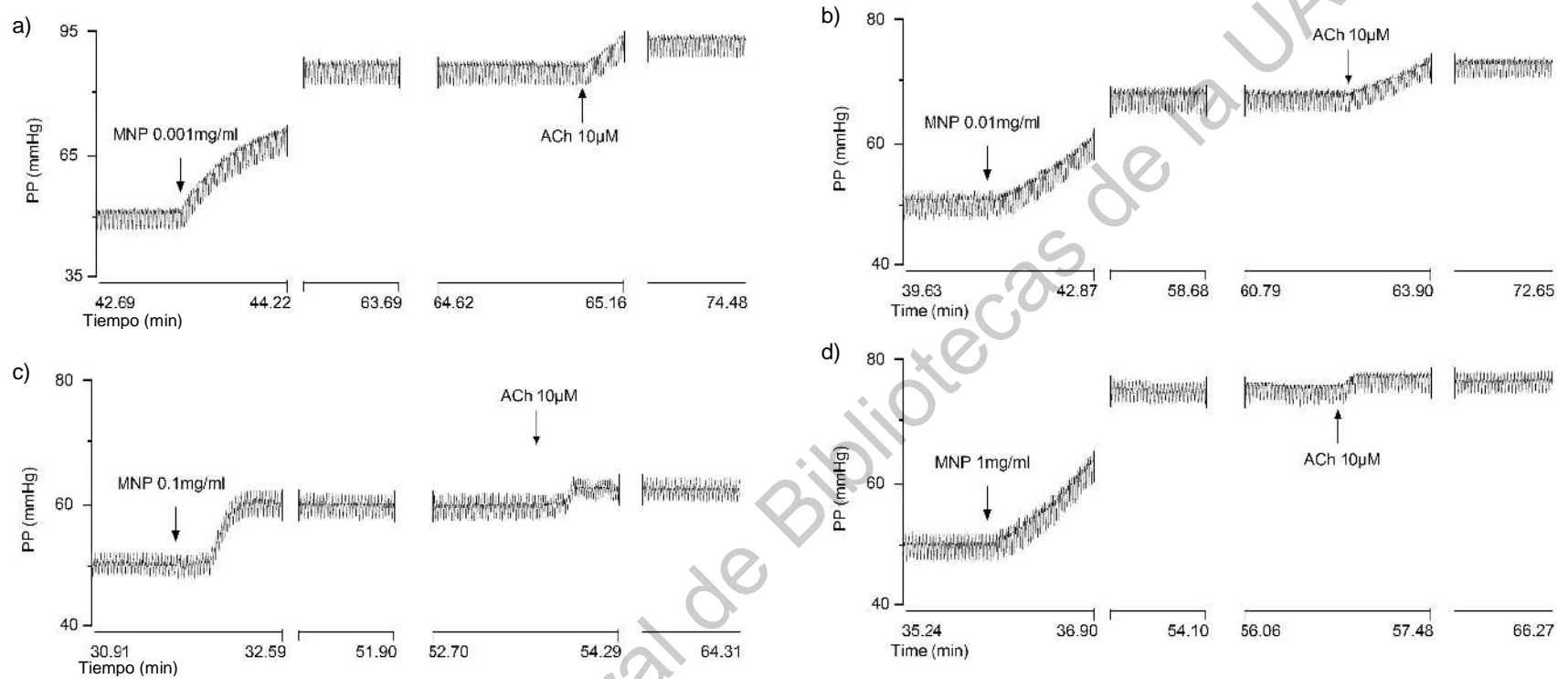


Figura 25.- Registros representativos de los análisis individuales de las concentraciones administradas anteriormente, a) 0.001 b) 0.01 c) 0.1 y d) 1 mg/mL de las MNP de forma individual. Se ajustó la escala para apreciar los diferentes efectos de las partículas.

Al aplicar las MNP en concentraciones separadas se observó un cambio significativo en el cambio en la PP provocado en el corazón. Estas partículas presentaron un efecto similar que en las administraciones acumulativas (**Figura 25a**), aproximadamente 173% con respecto a la línea base en la concentración de 0.001 mgmL⁻¹. Sin embargo, es evidente que el efecto relajante que se observaba en los análisis acumulativos ya no está presente cuando se administra de forma individual, así como el efecto que tiene el tamaño (bajas concentraciones, mayor dispersión [117]) que las nanopartículas tienen dentro del tejido miocárdico en la concentración de 0.001 y 1 mgmL⁻¹ (**Figura 25a y 27d**) donde se observa una contractura del tejido elevándose a casi 100 mmHg (200%), más allá del control contráctil Nore (150%), a diferencia de los demás valores de concentración (**Figura 25b y 25c**). Sin embargo, los valores de NO obtenidos no reflejan las manifestaciones fisiológicas del corazón. En la **Figura 27b** se aprecia que no hay incremento de concentración del NO. Las concentraciones siguientes (0.01 y 0.1 mgmL⁻¹) mostraron un efecto considerablemente menor que la concentración 0.001 mgmL⁻¹, siguiendo un patrón de aglomeración, exponiendo un menor efecto contráctil a mayor concentración, aproximadamente el 151% en la concentración de 1 mgmL⁻¹, pero los niveles de NO se manifestaron en extremo elevados sin presentar una mayor respuesta contráctil (**Figura 27b**). La mayor concentración (1 mgmL⁻¹) se dio un incremento en la presión, debido posiblemente al tamaño de los aglomerados que se forman a mayor concentración; sin embargo, el efecto fue menor que la concentración más pequeña; nuevamente, los valores de NO recuperados no mostraron una respuesta clara a la contracción (**Figura 27b**).

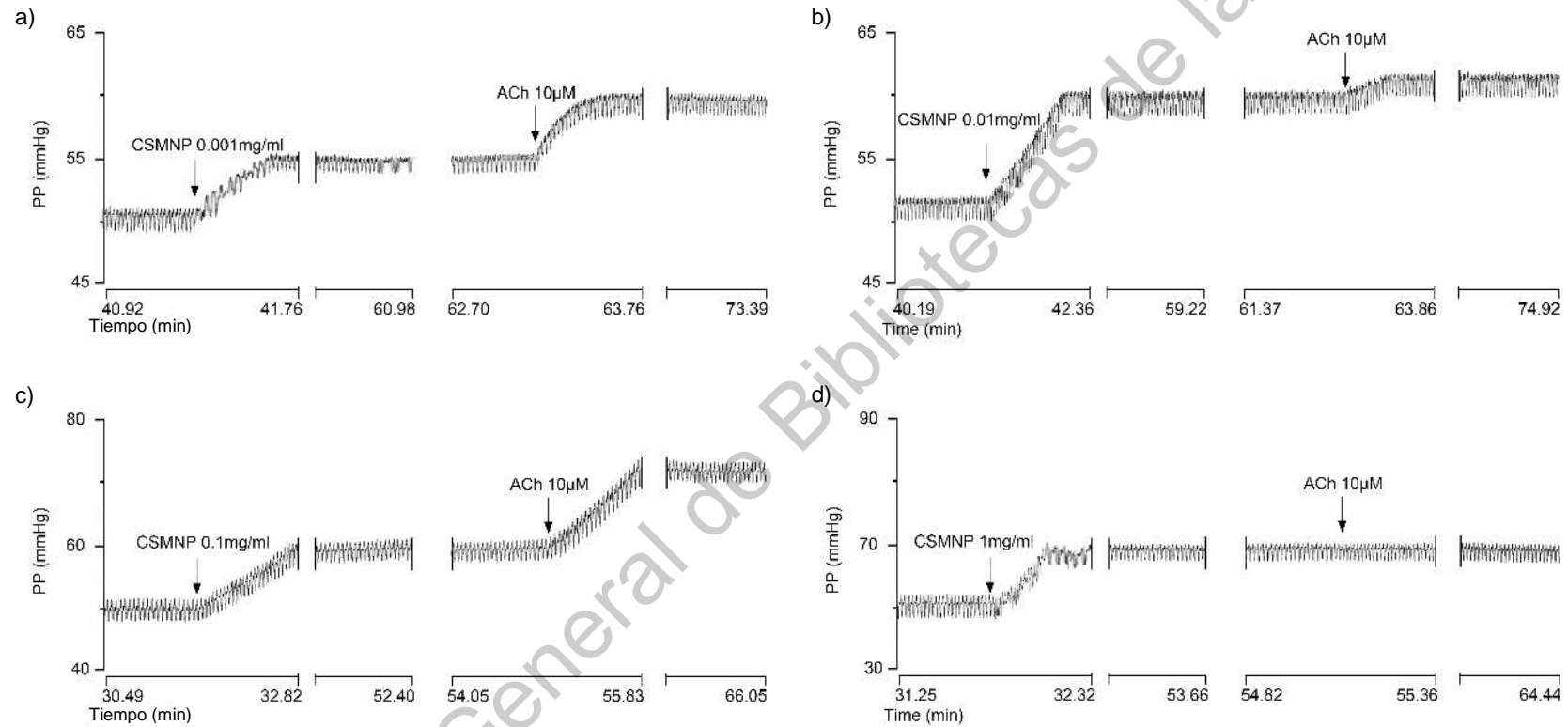


Figura 26.- Registros representativos de los análisis individuales de las concentraciones administradas anteriormente, a) 0.001 b) 0.01 c) 0.1 y d) 1 mg/mL de las CSMNP de forma individual. Se ajustó la escala para apreciar los diferentes efectos de cada una de las partículas.

Las CSMNP tuvieron efectos similares a los presentados en las administraciones continuas, con aumentos en la presión de alrededor del 110%, 122%, 117% y 154% con respecto a la línea base de las concentraciones 0.001 mgmL⁻¹, 0.01 mgmL⁻¹, 0.1 mgmL⁻¹ y 1 mgmL⁻¹ respectivamente, siguiendo un comportamiento concentración – respuesta. Sin embargo, al aplicar el control ACh la presión aumentó en las concentraciones 0.001 y 0.1 mgmL⁻¹ (193% y 143%, respectivamente con respecto a la línea base) (**Figura 26a** y **26c**) en los análisis obtenidos de NO se observó de nuevo el comportamiento de aumento de producción de NO con respecto a la concentración, pero de una manera elevada a lo visto en los análisis acumulativos (**Figura 24d** y **Figura 27d**).

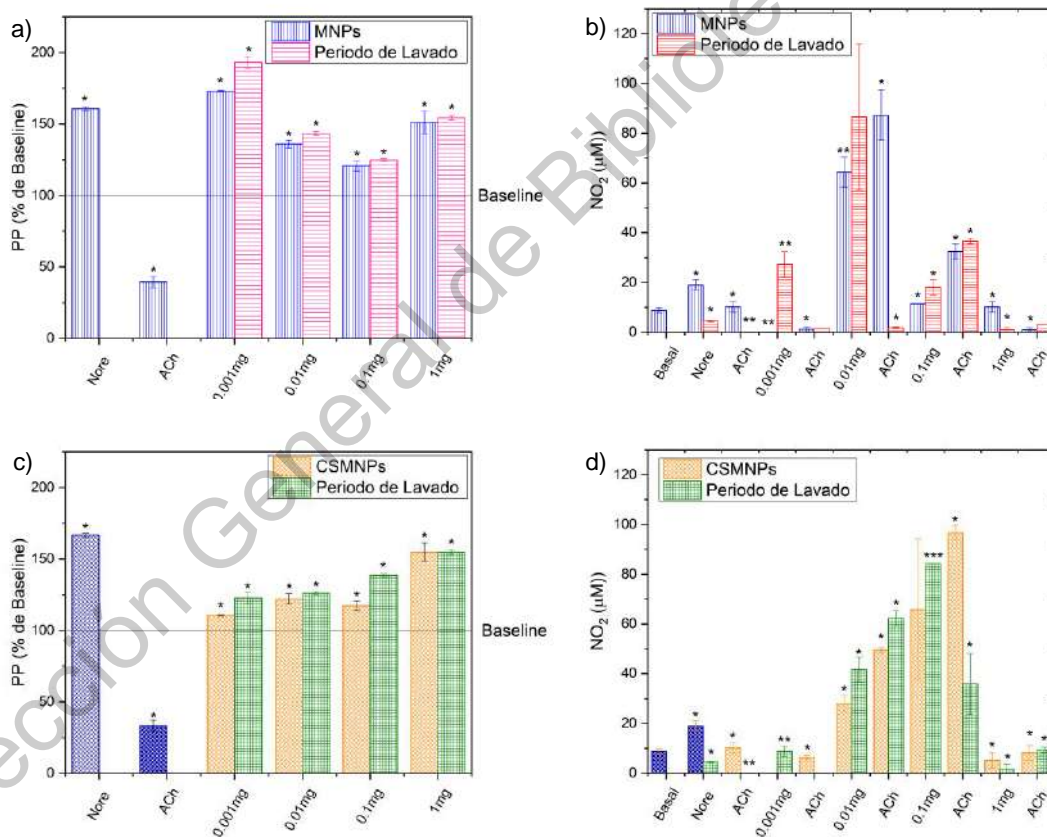


Figura 27.- Resultados estadísticos de los análisis individuales de las a) MNP; en las nanopartículas recubiertas se observó un efecto dosis - respuesta en c) CSMNP. La producción de NO se vio incrementada después de las administraciones de b) MNP y d) CSMNP. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía contra el control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

Las MNP presentan un efecto tóxico severo sobre el corazón aislado y perfundido debido a su tamaño, que pueden fácilmente entrar en contacto con las células [31], [33] y afectar diversas funciones en ella, la relativa facilidad de atraer a los iones presentes en la solución [110] y la lixiviación presente debido a los iones solubles de Fe^{2+} , incluyendo posiblemente la señalización del NO [118], [119], pudiendo provocar de esta forma los efectos contrarios de la contracción observados en la ACh (**Figura 28a**) [120] actuando como inhibidor del NO [80].

Las CSMNP en cambio, dado el recubrimiento de silicio y mayor tamaño, podría estar contenido la lixiviación de los iones solubles Fe^{2+} , sin embargo, la coloración de la solución y los análisis de distribución de tamaño y potencial Zeta revelan que el recubrimiento de las MNP es parcial, por lo que se observan resultados similares aunque de forma más débil, con el NO (**Figura 28b**).

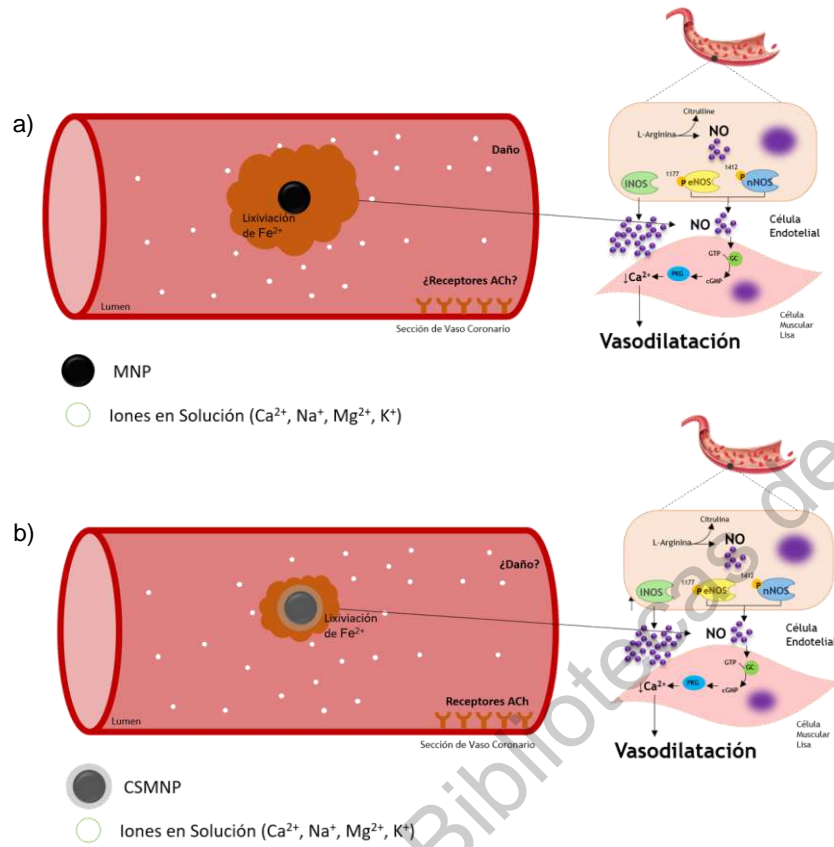


Figura 28.- Ilustración de los efectos que las a) MNP y b) CSMNP pueden tener dentro de los vasos coronarios.

CAPITULO VIII

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Conclusiones

Mediante la asistencia de sonoquímica en la síntesis de la estructura de óxido de hierro se logró obtener el arreglo de la estructura de espinela para la magnetita en lugar de su contraparte no ferromagnética, maghemita, estableciendo uno de los métodos económicos para sintetizar MNP y la falta de tratamiento térmico no permitió una buena calidad cristalina.

La capa de silicio proporciona una solución a la mayor desventaja que pueden tener las MNP, su nivel de citotoxicidad, cayendo al menos tres órdenes de magnitud, lo que los convierte en una opción viable para su uso dentro del cuerpo, a primera vista.

Las MNP indujeron efectos duales al ser aplicados de forma continua y presentaron un efecto contráctil sostenido, junto con una inhibición de los efectos de ACh en forma individual y continua, posiblemente debido a la formación de óxidos de hierro y especies de iones Fe^{+2} , que podrían interferir en la vía de señalización de NO al ser inhibidores de este al atrapar el oxígeno del NO, ocasionando que las células del músculo liso sean incapaces de realizar la relajación adecuadamente.

Las CSMNP presentaron efectos característicos de dosis-respuesta en ambos análisis debido a la agregación, aumento de tamaño y recubrimiento parcial de sílice, lo que implica la posibilidad de un uso viable para la reducción de los efectos tóxicos adversos de la MNP debido a que encapsulan parcialmente al material magnético evitando la lixiviación de las especies solubles Fe^{2+} .

Debido a la tensión observada en el corazón a lo largo del análisis, se propone que la magnetita debe administrarse y manejarse con extremo cuidado y en concentraciones inferiores a 0.001 mgmL^{-1} .

Perspectivas a futuro

Dados los resultados obtenidos de la presente investigación realizada, se propone que el trabajo continúe para cubrir aspectos restantes, tales como:

- Cuantificar la cantidad de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} , mediante la técnica de absorción atómica, presentes dentro de las alícuotas antes y después de que pasaron por perfusión dentro del corazón y así encontrar la cantidad de iones contenidos dentro del tejido.
- Realizar los cortes histológicos y su análisis bajo los diferentes tratamientos realizados para observar el cambio que causaron las partículas al interactuar con éste (contemplados en el trabajo, sin embargo, dada la contingencia sanitaria no fue posible realizarlas).
- Determinar la bioacumulación de hierro dentro del tejido mediante la técnica de tinción de Perls.
- Cambiar las concentraciones del precursor de silicio para asegurar el recubrimiento de los materiales magnéticos.
- Mejorar las condiciones de tratamiento térmico en la síntesis para obtener una mejor calidad cristalina y obtener una morfología definida para observar los efectos de la cristalinidad dentro del tejido.

Referencias Bibliográficas

- [1] J. Lee, J. Kim, and T. Hyeon, "Recent progress in the synthesis of porous carbon materials," *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 16, pp. 2073–2094, 2006.
- [2] W. N. Missaoui, R. D. Arnold, and B. S. Cummings, "Toxicological status of nanoparticles: What we know and what we don't know," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 295, no. July, pp. 1–12, 2018.
- [3] I. P. Kaur, V. Kakkar, P. K. Deol, M. Yadav, M. Singh, and I. Sharma, "Issues and concerns in nanotech product development and its commercialization," *J. Control. Release*, vol. 193, pp. 51–62, 2014.
- [4] K. Donaldson, V. Stone, C. L. Tran, W. Kreyling, and P. J. A. Borm, "Nanotoxicology," *Occup. Environ. Med.*, vol. 61, no. 9, pp. 727–728, 2004.
- [5] V. D. Krishna, K. Wu, D. Su, M. C. J. Cheeran, J. P. Wang, and A. Perez, "Nanotechnology: Review of concepts and potential application of sensing platforms in food safety," *Food Microbiol.*, vol. 75, pp. 47–54, 2018.
- [6] J. J. Ramsden, "Nanotechnology in a Modern Economy," in *Applied Nanotechnology*, Third., William Andrew, 2018, pp. 61–80.
- [7] M. E. Vance, T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella, and D. R. Hull, "Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 1, pp. 1769–1780, 2015.
- [8] N. Kumar and R. Kumar, *Nanotechnology and nanomaterials in the treatment of life-threatening diseases : nanomedicine, diagnostics and drug delivery*. 2014.
- [9] X. Chen and H. J. Schluesener, "Nanosilver: A nanoproduct in medical application," *Toxicol. Lett.*, vol. 176, no. 1, pp. 1–12, 2008.
- [10] A. Ramirez-Lee Manuel *et al.*, "Evaluation of vascular tone and cardiac contractility in response to silver nanoparticles, using Langendorff rat heart preparation," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 13, no. 4, pp. 1507–1518, 2017.
- [11] M. Z. Ansar, S. Atiq, S. Riaz, and S. Naseem, *Magnetite Nano-crystallites for Anti-cancer Drug Delivery*, vol. 2, no. 10. Elsevier Ltd., 2015.
- [12] W. Wei, X. Zhang, S. Zhang, G. Wei, and Z. Su, "Biomedical and bioactive engineered nanomaterials for targeted tumor photothermal therapy: A review," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 104, no. June, p. 109891, 2019.
- [13] H. Rosas-Hernández *et al.*, "Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings," *Toxicol. Lett.*, vol. 191, no. 2–3, pp. 305–313, 2009.
- [14] C. P. Biphenyls, "HHS Public Access," vol. 91, no. 2, pp. 165–171, 2015.
- [15] M. MIYAGAWA, *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) and its Implementation in Japan*, vol. 65, no. 1. 2010.
- [16] European Chemicals Agency, "Understanding REACH - ECHA." [Online]. Available: <https://echa.europa.eu/regulations/reach/understanding-reach>. [Accessed: 26-Sep-2018].
- [17] "Overview of REACH information requirements and available methods - European

- Observatory for Nanomaterials.” [Online]. Available: <https://euon.echa.europa.eu/reach-test-methods-for-nanomaterials>. [Accessed: 20-Jan-2020].
- [18] M. Mirafteb, *Summary and future of nanomaterials in medicine/biomaterials*, vol. 75. Elsevier Ltd, 2017.
- [19] Secretaría del Trabajo y Previsión Social, “NOM-018-STPS-2015 Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo,” 2015.
- [20] Secretaría de Economía, “Norma Mexicana Nmx-R-019-Scfi-2011 Sistema Armonizado De Clasificación. Globally Harmonized System (Ghs),” p. 485, 2011.
- [21] N. Singh, G. J. S. Jenkins, R. Asadi, and S. H. Doak, “Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION),” *Nano Rev.*, vol. 1, no. 1, p. 5358, 2010.
- [22] R. J. Harrison, R. E. Dunin-Borkowski, and A. Putnis, “Direct imaging of nanoscale magnetic interactions in minerals,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 26, pp. 16556–16561, 2002.
- [23] D. V. Voronin *et al.*, “In Vitro and in Vivo Visualization and Trapping of Fluorescent Magnetic Microcapsules in a Bloodstream,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 8, pp. 6885–6893, 2017.
- [24] A. Rafieepour *et al.*, “Investigation of the effect of magnetite iron oxide particles size on cytotoxicity in A549 cell line,” *Toxicol. Ind. Health*, vol. 35, no. 11–12, pp. 703–713, 2019.
- [25] J. Pauluhn, “Subchronic inhalation toxicity of iron oxide (magnetite, Fe₃O₄) in rats: Pulmonary toxicity is determined by the particle kinetics typical of poorly soluble particles,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 32, no. 7, pp. 488–504, 2012.
- [26] Y. Yu *et al.*, “Combined toxicity of amorphous silica nanoparticles and methylmercury to human lung epithelial cells,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 112, pp. 144–152, 2015.
- [27] Z. Magdolenova, A. Collins, A. Kumar, A. Dhawan, V. Stone, and M. Dusinska, “Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles,” *Nanotoxicology*, vol. 8, no. 3, pp. 233–278, 2014.
- [28] V. Stone, H. Johnston, and R. P. F. Schins, “Development of in vitro systems for nanotoxicology: Methodological considerations in vitro methods for nanotoxicology Vicki Stone *et al.*,” *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 39, no. 7, pp. 613–626, 2009.
- [29] M. Auffan *et al.*, “In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxic study,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, no. 14, pp. 4367–4373, 2006.
- [30] V. Stone *et al.*, “Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation,” *Sci. Total Environ.*, vol. 408, no. 7, pp. 1745–1754, 2010.
- [31] K. Shimizu, H. Nakamura, and S. Watano, “MD simulation study of direct permeation of a nanoparticle across the cell membrane under an external electric field,” *Nanoscale*, vol. 8, no. 23, pp. 11897–11906, 2016.

- [32] D. R. Tobergte and S. Curtis, *Molecular biology of the cell*, vol. 53, no. 9. 2013.
- [33] A. Verma and F. Stellacci, "Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions," *Small*, vol. 6, no. 1, pp. 12–21, 2010.
- [34] H. Schulz *et al.*, "Cardiovascular effects of fine and ultrafine particles.," *J. Aerosol Med.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–22, 2005.
- [35] M. Kendall, P. Ding, and K. Kendall, "Particle and nanoparticle interactions with fibrinogen: The importance of aggregation in nanotoxicology," *Nanotoxicology*, vol. 5, no. 1, pp. 55–65, 2011.
- [36] H.-W. Yuen and W. G. Gossman, *Toxicity, Iron*. StatPearls Publishing, 2018.
- [37] R. Miethling-Graff *et al.*, "Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells," *Toxicol. Vitro.*, vol. 28, no. 7, pp. 1280–1289, 2014.
- [38] M. H. Razavian and M. Masaimanesh, "Ingestion of silver nanoparticles leads to changes in blood parameters Blood parameter changes by silver nanoparticles," *Nanomed J*, vol. 1, no. 5, pp. 339–345, 2015.
- [39] O. K. Arriortua *et al.*, "RGD-Functionalized Fe₃O₄ nanoparticles for magnetic hyperthermia," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 165, pp. 315–324, 2018.
- [40] O. Životský *et al.*, "Magnetically Modified TiO₂ Powders - Microstructure and Magnetic Properties," *Phys. Procedia*, vol. 75, pp. 1450–1457, 2015.
- [41] W. S. Aronow, "Cardiovascular System," *Encycl. Biomed. Gerontol.*, pp. 351–356, Jan. 2020.
- [42] M. A. Ramirez-Lee *et al.*, "Evaluation of cardiovascular responses to silver nanoparticles (AgNPs) in spontaneously hypertensive rats," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 14, no. 2, pp. 385–395, 2018.
- [43] M. A. Ramirez-Lee, R. Espinosa-Tanguma, R. Mejía-Elizondo, A. Medina-Hernández, G. A. Martínez-Castañón, and C. Gonzalez, "Effect of silver nanoparticles upon the myocardial and coronary vascular function in isolated and perfused diabetic rat hearts," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 13, no. 8, pp. 2587–2596, 2017.
- [44] C. Gonzalez, H. Rosas-Hernandez, M. A. Ramirez-Lee, S. Salazar-García, and S. F. Ali, "Role of silver nanoparticles (AgNPs) on the cardiovascular system," *Arch. Toxicol.*, 2016.
- [45] D. B. Warheit, P. J. A. Borm, C. Hennes, and J. Lademann, "Testing strategies to establish the safety of nanomaterials: Conclusions of an ECETOC workshop," *Inhal. Toxicol.*, vol. 19, no. 8, pp. 631–643, 2007.
- [46] Y. Chen and X. Jin, "Preparation of Fe₃O₄@SiO₂@BiO_{1.8}-0.04H₂O/Ag₃PO₄ magnetic nanocomposite and its photocatalytic performance," *Ceram. Int.*, vol. 45, no. 1, pp. 1283–1292, 2019.
- [47] J. Liu, S. Z. Qiao, Q. H. Hu, and G. Q. Lu, "Magnetic nanocomposites with mesoporous structures: Synthesis and applications," *Small*, vol. 7, no. 4, pp. 425–443, 2011.
- [48] E. A.-M. E. Kenneth W. B. Richard A. B. and B. G.N., "Handbook of Mineralogy Crystal Data :," p. 4129, 2010.

- [49] D. R. Askeland, P. P. Fulay, and W. J. Wright, *The science and engineering of materials*, 6th ed. CENGAGE Learning, 2009.
- [50] Y. Chi *et al.*, "Synthesis of Fe₃O₄@SiO₂-Ag magnetic nanocomposite based on small-sized and highly dispersed silver nanoparticles for catalytic reduction of 4-nitrophenol," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 383, no. 1, pp. 96–102, 2012.
- [51] P. C. Pinheiro, A. L. Daniel-da-Silva, D. S. Tavares, M. P. Calatayud, G. F. Goya, and T. Trindade, "Fluorescent magnetic bioprobes by surface modification of magnetite nanoparticles," *Materials (Basel)*, vol. 6, no. 8, pp. 3213–3225, 2013.
- [52] H. Ahmad Panahi and H. S. Alaei, "β-Cyclodextrin/thermosensitive containing polymer brushes grafted onto magnetite nano-particles for extraction and determination of venlafaxine in biological and pharmaceutical samples," *Int. J. Pharm.*, vol. 476, no. 1, pp. 178–184, 2014.
- [53] A. Rosales, A. Maury-Ramírez, R. M. De Gutiérrez, C. Guzmán, and K. Esquivel, "SiO₂@TiO₂ coating: Synthesis, physical characterization and photocatalytic evaluation," *Coatings*, vol. 8, no. 4, pp. 1–13, 2018.
- [54] D. M. de Santiago Colín *et al.*, "Sonochemical coupled synthesis of Cr-TiO₂-supported on Fe₃O₄ structures and chemical simulation of the degradation mechanism of Malachite Green dye," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 364, no. May, pp. 250–261, 2018.
- [55] Y. Deng, D. Qi, C. Deng, X. Zhang, and D. Zhao, "Superparamagnetic high-magnetization microspheres with an Fe₃O₄@SiO₂ core and perpendicularly aligned mesoporous SiO₂ shell for removal of microcystins," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 1, pp. 28–29, 2008.
- [56] A. J. Carmona-Carmona, M. A. Palomino-Ovando, O. Hernández-Cristobal, E. Sánchez-Mora, and M. Toledo-Solano, "Synthesis and characterization of magnetic opal/Fe₃O₄ colloidal crystal," *J. Cryst. Growth*, vol. 462, no. December 2016, pp. 6–11, 2017.
- [57] H.-W. Yuen and W. Becker, *Iron Toxicity*. StatPearls Publishing, 2019.
- [58] I. Reference and E. Level, "Silica (crystalline, respirable)," no. February, pp. 1–48, 2005.
- [59] A. Liberman, N. Mendez, W. C. Trogler, and A. C. Kummel, "Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine," *Surf. Sci. Rep.*, vol. 69, no. 2–3, pp. 132–158, 2014.
- [60] H. Nomura and S. Koda, *What Is Sonochemistry?* Elsevier Inc., 2015.
- [61] J. Shriki, "Ultrasound physics," *Crit. Care Clin.*, vol. 30, no. 1, pp. 1–24, 2014.
- [62] S. Saito, "Ultrasound Field and Bubbles," in *Sonochemistry and the Acoustic Bubble*, Elsevier Inc., 2015, pp. 11–39.
- [63] Q. Ruan *et al.*, "Ultrasonic-irradiation-assisted oriented assembly of ordered monetite nanosheets stacking," *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 4, pp. 1100–1106, 2009.
- [64] F. Dang, K. Kato, H. Imai, S. Wada, H. Haneda, and M. Kuwabara, "Oriented aggregation of BaTiO₃ nanocrystals and large particles in the ultrasonic-assistant

- synthesis," *CrystEngComm*, vol. 12, no. 11, pp. 3441–3444, 2010.
- [65] S. E. Skrabalak and K. S. Suslick, "Porous MoS₂ synthesized by ultrasonic spray pyrolysis," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 28, pp. 9990–9991, 2005.
- [66] A. Morel *et al.*, "Sonochemical Approach to the Synthesis of Fe₃O₄@SiO₂ Core-Shell Nanoparticles with Tunable Properties," *ACS Nano*, vol. 2, no. 5, pp. 847–856, 2008.
- [67] S. Sarpong-Kumankomah, M. A. Gibson, and J. Gailer, "Organ damage by toxic metals is critically determined by the bloodstream," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 374, pp. 376–386, 2018.
- [68] G. J. Tortora and B. Derrickson, *Principios de anatomía y fisiología*, 11th ed. 2013.
- [69] K. Rogers, "The Cardiovascular System (The Human Body)." Britannica, 2010.
- [70] K. W. Park, H. B. Dai, E. Lowenstein, and F. W. Sellke, "Vasomotor responses of rat coronary arteries to isoflurane and halothane depend on preexposure tone and vessel size," *Anesthesiology*, vol. 54, no. 3, pp. 227–236, 1981.
- [71] H.-G. Zimmer, "The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers," *Physiology*, vol. 13, no. 4, pp. 203–210, 1998.
- [72] R. M. Bell, M. M. Mocanu, and D. M. Yellon, "Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 50, no. 6, pp. 940–950, 2011.
- [73] C. Gonzalez, G. Navarro Tovar, and M. A. Ramírez Lee, "Perfil fisiológico de los nanomateriales," *Mundo Nano. Rev. Interdiscip. en Nanociencia y Nanotecnología*, vol. 11, no. 20, p. 27, 2018.
- [74] I. Y. T. Kuo, S. E. Wölfle, and C. E. Hill, "T-type calcium channels and vascular function: The new kid on the block?," *J. Physiol.*, vol. 589, no. 4, pp. 783–795, 2011.
- [75] I. Y. Kuo and B. E. Ehrlich, "Signaling in muscle contraction," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 2, 2015.
- [76] K. J. Chuang *et al.*, "Effects of zinc oxide nanoparticles on human coronary artery endothelial cells," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 93, pp. 138–144, 2016.
- [77] S. A. Mohamed *et al.*, "Locally different endothelial nitric oxide synthase protein levels in ascending aortic aneurysms of bicuspid and tricuspid aortic valve," *Cardiol. Res. Pract.*, vol. 1, no. 1, 2012.
- [78] P. Pacaud and T. B. Bolton, "Relation between muscarinic receptor cationic current and internal calcium in guinea-pig jejunal smooth muscle cells.," *J. Physiol.*, vol. 441, no. 1, pp. 477–499, 1991.
- [79] T. B. Bolton and S. P. Lim, "Action of acetylcholine on smooth muscle.," *Z. Kardiol.*, vol. 80 Suppl 7, pp. 73–7, 1991.
- [80] V. C. Wong and E. Lerner, "Nitric oxide inhibition strategies," *Futur. Sci. OA*, vol. 1, no. 1, 2015.
- [81] M. Hernández, D. Prieto, U. Simonsen, L. Rivera, M. V. Barahona, and A. García-Sacristán, "Noradrenaline modulates smooth muscle activity of the isolated intravesical ureter of the pig through different types of adrenoceptors," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 107, no. 4, pp. 924–931, 1992.

- [82] G. Haeusler, "Relationship between noradrenaline-induced depolarization and contraction in vascular smooth muscle," *Blood Vessels*, vol. 15, no. 1–3, pp. 46–54, 1978.
- [83] H. Karaki, N. Urakawa, and P. Kutsy, "Potassium-induced contraction in smooth muscle," *Japanese J. Smooth Muscle Res.*, vol. 20, no. 6, pp. 427–444, 1984.
- [84] P. Aisen, C. Enns, and M. Wessling-Resnick, "Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 33, no. 10, pp. 940–959, 2001.
- [85] A. G. Quintero-Gutiérrez, G. González-Rosendo, J. Sánchez-Muñoz, J. Polo-Pozo, and J. J. Rodríguez-Jerez, "Bioavailability of heme iron in biscuit filling using piglets as an animal model for humans," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 58–62, 2008.
- [86] M. L. Guerinot, "Microbial Iron Transport," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 743–772, 1994.
- [87] N. Abbaspour, R. Hurrell, and R. Kelishadi, "Review on iron and its importance for human health.," *J. Res. Med. Sci.*, vol. 19, no. 2, pp. 164–74, Feb. 2014.
- [88] H. Liu, S. Ji, H. Yang, H. Zhang, and M. Tang, "Ultrasonic-assisted ultra-rapid synthesis of monodisperse meso-SiO₂@Fe₃O₄ microspheres with enhanced mesoporous structure," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 21, no. 2, pp. 505–512, 2014.
- [89] D. B. B. Marky Pitts, Kathryn Bayne, Lynn C. anderson, "Care and Use Institutional Animal Care and Use," *Sect. B*, pp. 43–49, 2002.
- [90] C. Gonzalez *et al.*, "16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation," *Endocrinology*, vol. 145, no. 12, pp. 5714–5722, 2004.
- [91] M. Skrzypiec-Spring, B. Grotthus, A. Szelag, and R. Schulz, "Isolated heart perfusion according to Langendorff-Still viable in the new millennium," *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 55, no. 2, pp. 113–126, 2007.
- [92] N. S. Bryan and M. B. Grisham, "Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 43, no. 5, pp. 645–657, 2007.
- [93] P. Corporation, K. M. Miranda, M. G. Espey, and D. a Wink, "Griess Reagent System," *Nitric Oxide*, vol. 5, no. 1, p. 7, 2009.
- [94] R. J. Hunter, *ZETA POTENTIAL IN COLLOID SCIENCE Principles and Application*, no. 1. 2014.
- [95] M. F. Meléndrez, G. Cárdenas, and J. Arbiol, "Synthesis and characterization of gallium colloidal nanoparticles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 346, no. 2, pp. 279–287, 2010.
- [96] L. Yang, N. Li, K. Wang, X. Hai, J. Liu, and F. Dang, "A novel peptide/Fe₃O₄@SiO₂-Au nanocomposite-based fluorescence biosensor for the highly selective and sensitive detection of prostate-specific antigen," *Talanta*, vol. 179, no. September 2017, pp. 531–537, 2018.
- [97] M. Mostafaei, S. N. Hosseini, M. Khatami, A. Javidanbardan, A. A. Sepahy, and E. Asadi, "Isolation of recombinant Hepatitis B surface antigen with antibody-conjugated superparamagnetic Fe₃O₄/SiO₂core-shell nanoparticles," *Protein Expr. Purif.*, vol. 145, no. September 2017, pp. 1–6, 2018.

- [98] F. Tian *et al.*, "Fates of Fe₃O₄ and Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles in human mesenchymal stem cells assessed by synchrotron radiation-based techniques," *Biomaterials*, vol. 35, no. 24, pp. 6412–6421, 2014.
- [99] S. Luo, Y. Liu, H. Rao, Y. Wang, and X. Wang, "Fluorescence and magnetic nanocomposite Fe₃O₄@SiO₂@Au MNPs as peroxidase mimetics for glucose detection," *Anal. Biochem.*, vol. 538, pp. 26–33, 2017.
- [100] L. F. Espinosa-Cristobal *et al.*, "Toxicity, distribution, and accumulation of silver nanoparticles in Wistar rats," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 15, no. 6, 2013.
- [101] L. M. Kustov *et al.*, "Silicon nanoparticles: characterization and toxicity studies," *Environ. Sci. Nano*, vol. 5, no. 12, pp. 2945–2951, 2018.
- [102] A. Khorsand Zak, W. H. Abd. Majid, M. E. Abrishami, and R. Yousefi, "X-ray analysis of ZnO nanoparticles by Williamson-Hall and size-strain plot methods," *Solid State Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 251–256, 2011.
- [103] K. Dinov, K. Ishigure, C. Matsuura, and D. Hiroishi, "Solubility of magnetite in high temperature water and an approach to generalized solubility computations," *J. Nucl. Mater.*, vol. 207, no. C, pp. 266–273, 1993.
- [104] L. B. Salviano, T. M. da Silva Cardoso, G. C. Silva, M. S. Silva Dantas, and A. de Mello Ferreira, "Microstructural assessment of magnetite nanoparticles (Fe₃O₄) obtained by chemical precipitation under different synthesis conditions," *Mater. Res.*, vol. 21, no. 2, 2018.
- [105] I. Nedkov *et al.*, "Raman spectroscopy investigation of magnetite nanoparticles in ferrofluids," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 322, no. 14, pp. 1904–1911, 2010.
- [106] Q. Fan, Y. Guan, Z. Zhang, G. Xu, Y. Yang, and C. Guo, "A new method of synthesis well-dispersion and dense Fe₃O₄@SiO₂ magnetic nanoparticles for DNA extraction," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 715, no. November 2018, pp. 7–13, 2019.
- [107] M. W. McElhinny and P. L. McFadden, "Paleomagnetism," *Int. Geophys.*, vol. 73, no. C, pp. 79–136, 2000.
- [108] G. A. Paterson, X. Zhao, M. Jackson, and D. Heslop, "Measuring, Processing, and Analyzing Hysteresis Data," *Geochemistry, Geophys. Geosystems*, vol. 19, no. 7, pp. 1925–1945, 2018.
- [109] L. Tauxe, T. Pick, and C. Constable, "Wasp-waists, pot-bellies, and superparamagnetism," *J. Geophys. Res. B Solid Earth*, vol. 101, no. 95, pp. 571–583, 1996.
- [110] S. R. Lynch, "Interaction of Iron with Other Nutrients," *Nutr. Rev.*, vol. 55, no. 4, pp. 102–110, 2009.
- [111] "Cardiomyopathy - Symptoms and causes - Mayo Clinic." [Online]. Available: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cardiomyopathy/symptoms-causes/syc-20370709>. [Accessed: 04-Apr-2020].
- [112] R. Rastaldo *et al.*, "Nitric oxide and cardiac function," *Life Sci.*, vol. 81, no. 10, pp. 779–793, 2007.
- [113] G. Müller-Strahl, K. Kottenberg, H. G. Zimmer, E. Noack, and G. Kojda, "Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in

- the rat heart," *J. Physiol.*, vol. 522, no. 2, pp. 311–320, 2000.
- [114] D. C. Bartos, E. Grandi, and C. M. Ripplinger, "Ion channels in the heart," *Compr. Physiol.*, vol. 5, no. 3, pp. 1423–1464, 2015.
- [115] R. Kohen and A. Nyska, "Toxicologic Pathology Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena," *Toxicol. Pathol.*, vol. 30, no. 6, pp. 620–650, 2002.
- [116] A. G. Japp *et al.*, "Acute cardiovascular effects of apelin in humans: Potential role in patients with chronic heart failure," *Circulation*, vol. 121, no. 16, pp. 1818–1827, 2010.
- [117] I. V. Chernyshova, M. F. Hochella, and A. S. Madden, "Size-dependent structural transformations of hematite nanoparticles. 1. Phase transition," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 9, no. 14, pp. 1736–1750, 2007.
- [118] Y. Zhao, P. M. Vanhoutte, and S. W. S. Leung, "Vascular nitric oxide: Beyond eNOS," *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 129, no. 2, pp. 83–94, 2015.
- [119] A. M. Andrews, D. Jaron, D. G. Buerk, P. L. Kirby, and K. A. Barbee, "Direct, real-time measurement of shear stress-induced nitric oxide produced from endothelial cells in vitro," *Nitric Oxide - Biol. Chem.*, vol. 23, no. 4, pp. 335–342, 2010.
- [120] M. B. Colovic, D. Z. Krstic, T. D. Lazarevic-Pasti, A. M. Bondzic, and V. M. Vasic, "Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology," *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 11, no. 3, pp. 315–335, 2013.
- [121] M. G. Nieto López, "Fundamentos en la preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido." [Online]. Available: <https://docplayer.es/3046828-Fundamentos-en-la-preparacion-de-muestras-para-microscopia-electronica-de-barrido-m-c-maria-guadalupe-nieto-lopez.html>. [Accessed: 20-Mar-2020].
- [122] V. Everts, A. Niehof, W. Tigchelaar-Gutter, and W. Beertsen, *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*, vol. 1914. 2019.
- [123] N. Saunders and A.P.Miodownik, "CALPHAD: Calculation of Phase Diagrams," *Pergamon Mater. Ser.*, vol. 1, no. C, pp. 61–87, 1998.
- [124] Y. Waseda, E. Matsubara, and K. Shinoda, *X-Ray Diffraction Crystallography*, vol. 46, no. 1. 2016.
- [125] H. G. M. Edwards, *Modern Raman spectroscopy—a practical approach. Ewen Smith and Geoffrey Dent. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 2005. Pp. 210. ISBN 0 471 49668 5 (cloth, hb); 0 471 49794 0 (pbk)*, vol. 36, no. 8. 2005.
- [126] E. A. Ko, M. Y. Song, R. Donthamsetty, A. Makino, and J. X. J. Yuan, "Tension measurement in isolated rat and mouse pulmonary artery," *Drug Discov. Today Dis. Model.*, vol. 7, no. 3–4, pp. 123–130, 2010.

Capítulo IX

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

VIII. Apéndices

A.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La principal función del microscopio electrónico de barrido (SEM) es ampliar pequeñas características u objetos que de otra manera serían invisibles para el ojo humano, mediante el uso de haz de electrones en lugar de luz visible que se utiliza para formar imágenes en microscopios ópticos. Las imágenes se obtienen escaneando un haz de electrones de alta energía en la superficie de la muestra, de ahí el nombre de microscopio electrónico de barrido, gracias a su menor longitud de onda, los electrones pueden “observar” características y detalles más finos de los materiales en un grado mucho mayor en comparación con la luz visible.

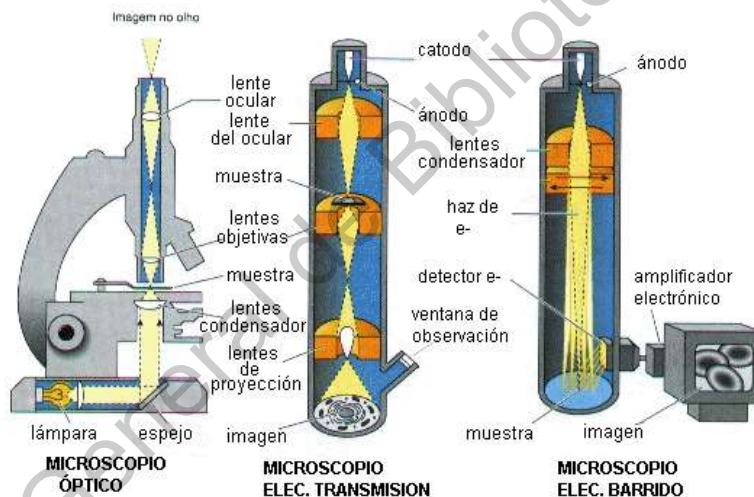


Figura A 1.- Comparación entre el microscopio óptico, microscopio de barrido y de transmisión [121].

Los electrones pueden ser también «reflejados» (retrodispersados), o pueden suministrar energía a los electrones de la muestra que pueden ser liberados como átomos secundarios (**Figura A 2**). Sin embargo, existe un método diferente para obtener imágenes a partir de los electrones: principio de exploración. Los electrones primarios se enfocan en una sonda electrónica de diámetro pequeño que se explora a través de la muestra, haciendo uso del hecho de que los campos electrostáticos o magnéticos, aplicados en ángulo recto al haz de electrones, se puede utilizar para

cambiar la dirección de desplazamiento. Al escanear simultáneamente en dos direcciones perpendiculares, se puede cubrir un área cuadrada o rectangular de la muestra (conocida como entramado) y se puede formar una imagen de esta área recolectando electrones secundarios de cada punto de la muestra.

A.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Los microscopios electrónicos fueron desarrollados debido a la limitada resolución de los microscopios ópticos, entendiéndose como resolución la escala más pequeña distinguible entre dos puntos; el ojo humano, por ejemplo, pueden llegar a distinguir entre 0.1-0.2 mm, así que se le puede llamar microscopio a cualquier instrumento que sea capaz de observar objetos menores a 0.1 mm. Al querer observar objetos más pequeños, se requería aumentar la resolución con ayuda de la luz visible (400-700 nm) y lentes de vidrio pulido se logró observar objetos menores hasta 400 nm, pero una vez más, se requirió una fuente luminosa más pequeña, los electrones (Figura A 1).

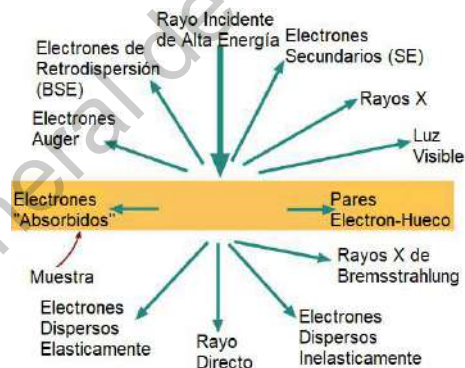


Figura A 2.- Señales generadas cuando un haz de electrones de alta energía interactúa con una muestra delgada, la dirección no es necesariamente la dirección que toman las radiaciones dispersas. La mayoría de estas señales se pueden detectar en diferentes tipos de TEM.

Una de las ventajas de utilizar radiación ionizante es la producción de un amplio espectro de señales de la muestra (Figura A 2).

El TEM presenta ciertos inconvenientes, el precio a pagar por cualquier técnica de imagen de alta resolución es que solo mira una pequeña parte de su muestra en

cualquier momento, cuanto mayor sea la resolución, peor serán las capacidades de muestreo del instrumento [122].

A.3. Potencial Zeta

Cuando dos fases entran en contacto se desarrolla, en general, una diferencia de potencial entre ellas. Si una de las fases es un líquido polar, como el agua, sus moléculas dipolares tenderán a orientarse en una dirección particular en la interfaz y esto generará una diferencia de potencial. Si hay iones, electrones o grupos iónicos presentes en una o ambas fases, habrá una tendencia a que las cargas eléctricas se distribuyan de manera no uniforme en la interfaz.

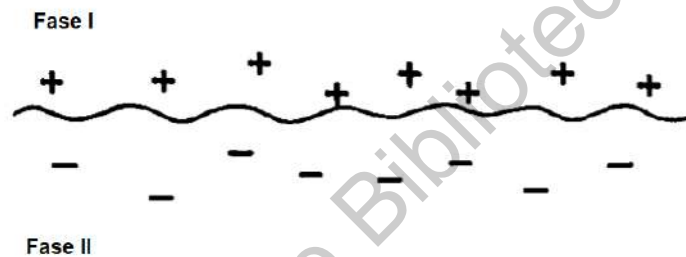


Figura A 3.- Posible distribución de cargas entre dos fases mostrando sólo la distribución del exceso de carga.

Si la superficie de la fase I está cargada positivamente, su potencial electrostático será positivo con respecto al límite de la fase II; si la fase II es un líquido que contiene iones disueltos, a medida que uno avanza hacia la fase II, el potencial se volverá negativo, y a medida en que se aleje de la fase I el potencial disminuirá, hasta que se vuelva constante en el interior del líquido lejos de la superficie de la fase I (**Figura A 3**). Se suele tomar este potencial “constante” en la mayor parte de una de las fases (generalmente un líquido) como referencia o potencial cero.

La carga eléctrica (o potencial) está ligado directa o indirectamente con muchas de las propiedades importantes de los sistemas coloidales de las partículas. La adsorción de iones y moléculas dipolares está determinada por esta carga y distribución potencial, que establece la energía de interacción entre las partículas,

responsable de la estabilidad de las partículas frente a la coagulación y de muchos aspectos del comportamiento del flujo de la suspensión coloidal. También es posible correlacionar el potencial ζ con el comportamiento de sedimentación de los sistemas coloidales [94].

A.4. Susceptibilidad Magnética

La medición de la susceptibilidad magnética es una técnica eficaz para determinar los límites de fase en los sistemas magnéticos, ya que hay un cambio distinto en las propiedades magnéticas durante una transición de fase. En esta técnica, la muestra se suspende sobre un péndulo y se aplica un campo magnético. La muestra se calienta o enfría a través de la transición de fase y la muestra se desvía de su posición debido al cambio en su magnetismo inherente [123]. El campo magnético se altera cambiando la corriente aplicada y el péndulo regresado a su posición original. La susceptibilidad magnética está definida como:

$$\chi = \left(\frac{K}{m}\right) \cdot I^2 \quad 1$$

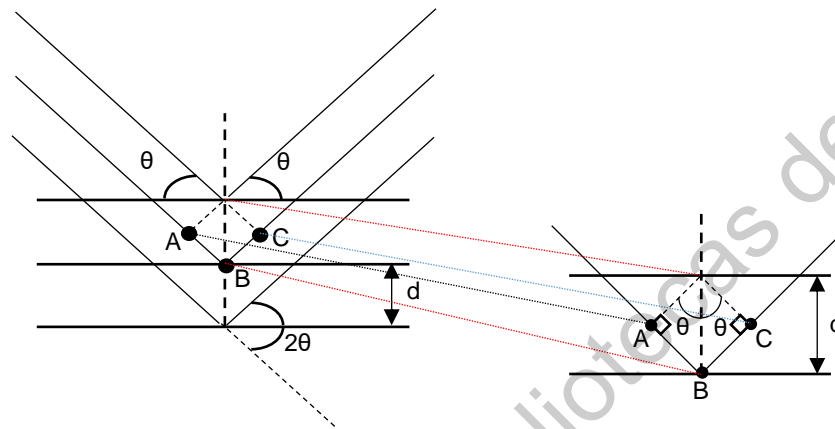
Donde χ es la susceptibilidad magnética, K es la constante de susceptibilidad, diferente para cada material, m la masa de la muestra e I es la corriente de compensación.

A.5. Difracción de Rayos X (XRD)

La difracción es el resultado de la dispersión de la radiación debido al arreglo periódico de centros colocados a distancias iguales que contienen un espaciado equivalente a la longitud de onda de la radiación incidente. Dado que las longitudes de onda de algunos rayos X son aproximadamente iguales a la distancia entre planos de los átomos en las estructuras cristalinas de los sólidos, pueden generar picos de difracción.

Cuando un haz de rayos X que tiene una longitud de onda determinada en el mismo orden de magnitud que el espaciado atómico en el material incidente, los rayos X

se dispersan en todas direcciones. La mayor parte de la radiación dispersada de un átomo se cancela por la interferencia destructiva de otros átomos; sin embargo, los rayos X que inciden sobre ciertos planos cristalográficos a ángulos específicos su interferencia es constructiva en lugar de destructiva. A este fenómeno se le conoce como difracción (**Figura A 4**). Esto sucede si y sólo si se satisface la ley de Bragg.



$$\overline{AB} = \overline{BC} = d \operatorname{sen} \theta$$

Entonces:

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen} \theta$$

Figura A 4.- Representación gráfica del efecto de difracción que ocurre dentro de las estructuras cristalinas.

Esta ecuación da la relación entre las posiciones angulares de los haces difractados reforzados en función de la longitud de onda λ de la radiación incidente y del espaciado interplanar d de los diferentes planos de las estructuras cristalinas, donde d es la distancia interplanar, θ es el ángulo de dispersión o ángulo de Bragg, λ es la longitud de onda de la radiación X y n es el orden de difracción. Sin embargo, es importante mencionar que la ley de Bragg es una condición necesaria mas no suficiente para que se lleve a cabo la difracción; si define la condición de difracción, pero sólo para celdas unitarias primitivas, es decir redes de Bravais con puntos reticulares en los vértices de la celda unitaria, como la estructura cúbica simple y tetragonal simple [124].

A.6. Espectroscopía Raman

La luz al interactuar con la materia produce una serie de fenómenos dependiendo de las propiedades de esta y sus fotones, los cuales pueden ser absorbidos, si el fotón posee una energía igual a la energía de banda prohibida. En el caso contrario, si la energía del fotón es menor a la energía necesaria para llevar a una molécula a su estado excitado, esta es dispersada. La dispersión es una buena técnica comúnmente usada para realizar mediciones de tamaño y distribución de partículas en tamaños menores a 1 μm . La radiación está dividida y caracterizada por su longitud de onda λ , que es fácilmente relacionada con las escalas intermedias de frecuencia ν o número de onda ω , linealmente relacionadas a la energía (**Figura A 5**).

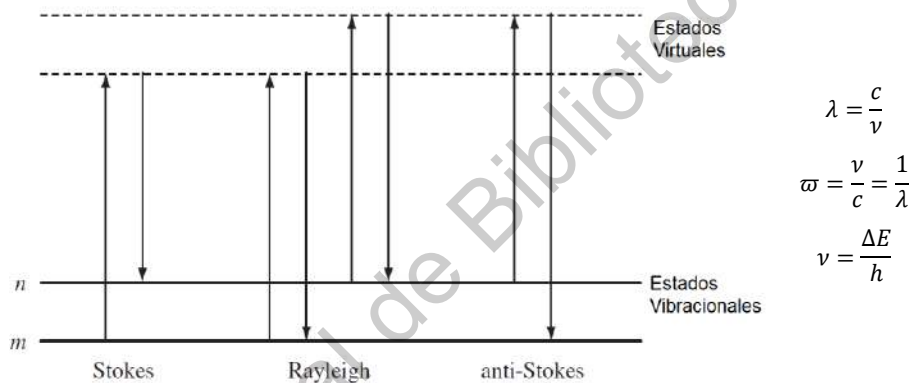


Figura A 5. Diagrama de las dispersiones Raman y Rayleigh [81].

La dispersión Raman utiliza una radiación monocromática producida para irradiar la muestra lo cual, al hacer vibrar las moléculas debido a la dispersión de esta radiación de baja energía, una unidad vibracional diferente a la de la radiación incidente, es detectada por el equipo [125].

A.7. Técnica de perfusión de corazón de Langendorff

Un método fiable y clásico para investigar la fisiología y la farmacología de vasos sanguíneos, vías respiratorias e intestinos es el sistema de tejidos aislados. Con los transductores adecuados, se puede obtener estímulos que proveen una gran variedad de señales, al mantener la longitud del tejido constante se puede evaluar la contractilidad (medición isotónica) mientras que la presión y carga puede ser

medida con un transductor mediante un material piezoeléctrico (medición isométrica) para detectar ligeras variaciones en el movimiento de pequeños segmentos de tejido (anillo aislado) [126]. Los sistemas murinos representan un sistema viable para estudiar distintas funciones y respuestas de ciertos órganos, fisiológicas y patológicas, que pueden clasificarse como orgánicos, tisulares y celulares. Dentro de estos modelos orgánicos se encuentra el modelo de corazón aislado de Langendorff, que son capaces de mantener su viabilidad y procesos fisiológicos en un periodo limitado. Estos órganos no se encuentran en un sistema cerrado, sino que se encuentran perfundidos, es decir, se hace pasar una solución fisiológica por los vasos coronarios del corazón, manteniendo los procesos fisiológicos de oxigenación, temperatura y pH [73].

A.8. Solución de Krebs para la preparación del Langendorff

Solución utilizada para la técnica de perfusión Langendorff. La solución se prepara en dos pasos:

A.8.1 Preparar la solución madre como se indica en la **Tabla A 1**.

Tabla A 1.- Solución Madre de la solución fisiológica de Krebs. Esta solución puede ser almacenada por largos periodos a 4°C.

Reactivo	Gramos por 1Lt de Solución	Concentración Final (milimolar)
NaCl	68.84	117.9
KCl	4.47	6.0
CaCl ₂	1.94	1.7
NaH ₂ PO ₄	1.44	1.2
MgSO ₄	1.44	1.2

A.8.2 A partir de la solución madre, se toman **100ml** para preparar **1Lt** de solución fisiológica de Krebs (**Tabla A 2**).

Tabla A 2.- Solución Krebs. Esta solución es preparada en el MOMENTO del experimento y NO puede ser almacenada.

Reactivo	Unidades por 1Lt de Solución	Concentración Final (milimolar)
NaHCO ₃	2.03 g	24.2
Dextrosa	0.90 g	5.0
Piruvato	0.55 g	5.0
Solución Madre	100 mL	-

1. La solución resultante debe ser neutralizada a pH siete mediante un constante burbujeo de una mezcla de gases de **95% O₂** y **5% CO₂** (15 minutos antes del experimento).
2. De esta solución, se debe tomar una alícuota considerable para preservar el corazón una vez extraído. Este volumen debe estar a **4°C**.