



CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA

TESIS
“EFECTOS HEMODINÁMICOS RENALES Y PROINFLAMATORIOS
DE LAS NPTIO₂ EN UN MODELO DE INTOXICACIÓN AGUDA E
INTERMITENTE EN RATA WISTAR MACHO”

PRESENTA:
IBT. Jaqueline Del Rocío De La Rosa Sandoval

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA

TUTOR
Dr. José Luis Quintanar Stephano

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL
Dra. María Consolación Martínez Saldaña
Dra. Cristina Garcidueñas Piña

Aguascalientes, Ags, Mayo de 2019



M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como Cotutor designado del estudiante **JAQUELINE DEL ROCIO DE LA ROSA SANDOVAL** con ID 222186 quien realizó la tesis titulada: "EFECTOS HEMODINÁMICOS RENALES Y PROINFLAMATORIOS DE LAS NPTIO₂ EN UN MODELO DE INTOXICACION AGUDA E INTERMITENTE EN RATA WISTAR MACHO" y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimir, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 30 de Mayo del 2019

Dr. José Luis Quintanar Stephano
Tutor de tesis

Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña
Asesor de tesis

Dra. Cristina Garcidueñas Piña
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Fisiología y Farmacología
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

JAQUELINE DEL ROCIO DE LA ROSA SANDOVAL
MAESTRIA EN CIENCIAS, AREA TOXICOLOGIA

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"EFECTOS HEMODINÁMICOS RENALES Y PROINFLAMATORIOS DE LAS NPTIO₂ EN UN MODELO DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE EN RATA WISTAR MACHO"** hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 31 de Mayo de 2019

"Se lumen proferre"

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

AGRADECIMIENTOS

A la UAA, al Centro de Ciencias Básicas, a Decanato, al Departamento de Fisiología y Farmacología por el apoyo otorgado, donde todo esto fue hecho.

Al CONACYT gracias por el apoyo económico mediante el programa de becas nacionales (No. De apoyo 443642) para la realización de este proyecto.

Muchas gracias a la Dra. Elsa Marcela Ramírez y al Dr. Francisco Morales, miembros del Consejo académico de maestría por su apoyo.

Agradezco profundamente a mi tutor el Dr. José Luis Quintanar Stephano y a la Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña por el apoyo brindado en este proyecto de tesis, quien con su dedicación lograron que culminara después de todo.

A la Dra. Cristina Garcidueñas Piña por unirse a esta travesía como asesora.

Al Dr. Andrés Quintanar Stephano que me brindó apoyo tanto en equipos como en espacio para continuar.

Agradezco profundamente a mi técnica Diana Regalado y a la Dra. Rosa María Chávez Morales por su apoyo incondicional dentro y fuera de laboratorio, sin ustedes este proyecto no hubiera surgido.

Al Dr. Bruno Marichal por darme oportunidad de terminar mis experimentos en el laboratorio 6, al igual que a su técnica Irma Reynoso quien estuvo para ayudarme cuando necesité.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado con mucho amor a mi esposo Omar Guerra Arteche, gracias a tu apoyo incondicional esto fue posible, sin ti esto no hubiera terminado bien, has sido mi ancla y mi guía en aquellos momentos oscuros, has sido la principal persona en festejar conmigo. Te amo.

A mi madre María de Jesús Sandoval, a mi abuela Beatriz López, a mis hermanas Erika y Chuyita, a mis sobrinos Mateo y Joshua, gracias porque a pesar de la distancia siempre han estado a mi lado apoyándome y echándome las porras necesarias para lograr lo que me he propuesto.

Muchas gracias a mis amigas Cynthia, Armida, Viridiana, Diana, esas comidas de estudio fueron cruciales en este proyecto, su ayuda fue gigante. A mis amigas Mily, Mirna, Clara, Perla, Yeye, gracias por los ánimos siempre están presentes. Liz tus ángeles estuvieron presentes. Las amo.

Gracias a los BCSC sus trenes hicieron llevadero todo momento de estrés.

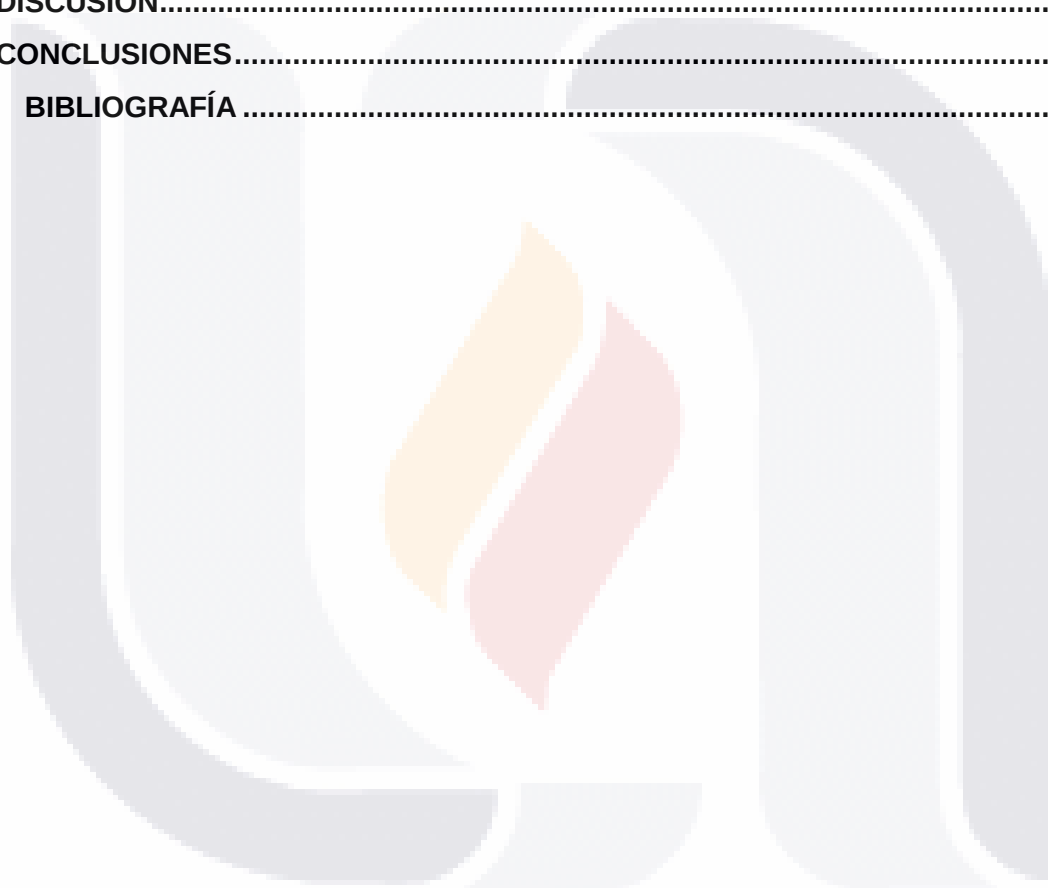
Agradezco al cielo por mi familia, de la que nací y a la que escogí, esto es para ustedes.

Gracias a todos.

INDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN.....	11
1.1.	NANOPARTÍCULAS.....	11
1.1.1.	CARACTERÍSTICAS.....	12
1.1.2.	USOS Y APLICACIONES.....	16
1.2.	DIÓXIDO DE TITANIO	19
1.2.1.	TOXICOCINÉTICA	20
1.2.2.	TOXICODINÁMICA	22
1.3.	RIÑÓN.....	24
1.3.1.	FISIOLOGÍA.....	25
1.4.	ESTRÉS OXIDATIVO.....	31
2.	ANTECEDENTES	36
3.	JUSTIFICACIÓN	38
4.	HIPOTESIS	38
5.	OBJETIVOS.....	39
5.1.	GENERAL	39
5.2.	ESPECÍFICOS.....	39
6.	METODOLOGÍA.....	40
6.1.	GRUPOS EXPERIMENTALES.....	40
6.2.	ESTUDIOS	41
6.2.1.	ESTUDIOS FUNCIONALES.....	41
6.2.2.	ESTUDIO ESTRUCTURAL	44
6.2.3.	ESTUDIO MOLECULAR.....	44
6.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
7.	RESULTADOS.....	45
7.1.	ANÁLISIS DE ACLARAMIENTO DE INULINA	45
7.2.	ANÁLISIS DE ACLARAMIENTO DE PARA-AMINOHIPURATO.	46
7.3.	FRACCIÓN DE FILTRACIÓN	47
7.4.	MANEJO RENAL DE AGUA.....	48
7.5.	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE SODIO	49
7.6.	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE OSMOLARIDAD URINARIA.....	52

7.7.	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GLUCOSA.....	53
7.8.	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE CREATININA.....	56
7.9.	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TGG EN ORINA	60
7.10.	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE MALONDIALDEHÍDO EN TEJIDO	61
7.11.	DETERMINACION CUANTITATIVA DE GSH.....	62
7.12.	ANALISIS ESTRUCTURAL RENAL	63
7.13.	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TNF- α EN PLASMA.....	65
8.	DISCUSION.....	66
9.	CONCLUSIONES.....	76
10.	BIBLIOGRAFÍA	78



INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 CLASIFICACIÓN DE NANOPARTICULAS DE ACUERDO A SU ASPECTO DIMENSIONAL (CORNEJO, 2015).	15
FIGURA 2 FORMA TRIDIMENSIONAL DE LAS NPS DE TIO ₂ : RUTILO, ANATASA Y BROOKITA (FELTRÍN ET AL, 2013).	19
FIGURA 3 TOXICOCINÉTICA DE NANOPARTÍCULAS TIO ₂ . SE MUESTRA LAS DIFERENTES RUTAS DE EXPOSICIÓN Y VÍAS DE ENTRADA DE LAS NPS DE TIO ₂ , ASÍ COMO SUS RUTAS DE TRANSPORTE Y DISTRIBUCIÓN POR LOS DIFERENTES ÓRGANOS Y SISTEMAS, SE MUESTRA LAS ALTERNATIVAS DE ELIMINACIÓN DE ESTAS NPS (SHI ET AL, 2013).	21
FIGURA 4 TOXICODINÁMIA DE LAS NPS DE TIO ₂ . LAS NANOPARTÍCULAS DE TIO ₂ ATRAVIESAN LA MEMBRANA CELULAR, EL ESTRÉS OXIDATIVO PRODUCIDO POR ESTAS MOLÉCULAS GENERA RADICALES LIBRES QUE DISMINUYEN LOS ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS COMO EL GLUTATIÓN AL MISMO TIEMPO QUE AUMENTAN LA LIPOPEROXIDACIÓN DAÑANDO LAS MEMBRANAS DE ORGANELOS Y ACTIVAN LOS MECANISMOS INDUCTORES DE APOPTOSIS O INDUCIENDO A NECROSIS CELULAR (SRIVASTVA ET AL, 2013).	24
FIGURA 5 ANATOMÍA A NIVEL MACROSCÓPICO DEL SISTEMA RENAL (HTTP://HNNNCBIOL.BLOGSPOT.COM).	26
FIGURA 6 ESQUEMA DE UN CORTE SAGITAL DEL RIÑÓN, PELVIS RENAL Y VASOS AFERENTES (GÓMEZ, 2014).	27
FIGURA 7 ESQUEMA DE LA NEFRONA Y LA VASCULARIZACIÓN RENAL (HALL ET AL, 2011).	29
FIGURA 8 CONFORMACIÓN DE LA NEFRONA (HTTP://RECURSOS.CNICE.MEC.ES)	30
FIGURA 9 PROCESO DE FILTRACIÓN GLOMERULAR, REABSORCIÓN, SECRECIÓN Y EXCRECIÓN (GÓMEZ, 2014).	31
FIGURA 10 RESPUESTA CELULAR FRENTE A LA FORMACIÓN DE EROS A TRAVÉS DE ESTÍMULOS FISIOLÓGICOS (POUROVA ET AL 2010).	33
FIGURA 11 ESQUEMA DE PRODUCCIÓN DE LAS ESPECIES ACTIVAS DE OXÍGENO (MENEGHINI, 1987).	34
FIGURA 12 PROCEDIMIENTO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL.	41
FIGURA 13 CORTES HISTOLÓGICOS DE RIÑÓN (5MM), TEÑIDOS CON HE Y OBSERVADOS A 10X; A) CONTROL; B) INT. AGUDA 24 HORAS; C) INT. AGUDA 7 DÍAS; D) INT. AGUDA 14 DÍAS; E) INT. AGUDA 28 DÍAS F) INT. INTERMITENTE.	64
FIGURA 14 ANÁLISIS DE TNF-A, MEDIANTE MÉTODO DE ELISA.	65

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 GRUPOS EXPERIMENTALES.....	40
TABLA 2 TÉCNICAS A UTILIZAR.....	43

INDICE DE GRAFICAS

GRÁFICA 1 EVALUACIÓN DEL C-IN (ML/MIN) EN GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. NO PRESENTA DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE LOS GRUPOS EVALUADOS.....	46
GRÁFICA 2. EVALUACIÓN DEL C-PAH (ML/MIN) EN GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$	47
GRÁFICA 3. EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN DE FILTRACIÓN EN LOS GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA: * $P < 0.01$	48
GRÁFICA 4. EVALUACIÓN DEL FLUJO URINARIO (ML/MIN) COMO MANEJO RENAL DE AGUA EN LOS GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA: * $P < 0.0001$	49
GRÁFICA 5 EVALUACIÓN DE C-NA (MG/MIN) EN LOS GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS: * $P < 0.01$ Y ** $P < 0.001$	50
GRÁFICA 6 EVALUACIÓN DE LA CF-NA (MEQ/MIN/KG) EN LOS GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS: * $P < 0.05$ Y ** $P < 0.001$	51
GRÁFICA 7 EVALUACIÓN DE EF-NA (%) EN LOS GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Y *** $P < 0.001$	52
GRÁFICA 8 EVALUACIÓN DE LA OSMOLARIDAD URINARIA (MOSM/ML) DE LOS GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. NO PRESENTA DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.....	53
GRÁFICA 9 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (MG/DL) EN PLASMA EN LOS GRUPOS AGUDOS E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA: * $P < 0.01$	54

GRÁFICA 10 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (MG/DL) EN ORINA EN LOS GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS: *P<0.05 Y **P<0.01.....	55
GRÁFICA 11 EVALUACIÓN DEL C-GLUCOSA (ML/MIN) EN GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE EN COMPARACIÓN CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA: *P<0.01.....	56
GRÁFICA 12 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CREATININA (MG/DL) EN PLASMA EN GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS: * P<0.01 Y ** P<0.001.	57
GRÁFICA 13 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CREATININA (MG/DL) EN ORINA EN GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS: * P<0.05 Y ** P<0.01.....	58
GRÁFICA 14 EVALUACIÓN DEL C-CREATININA (ML/MIN) EN GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA: * P<0.01.....	59
GRÁFICA 15 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE TGG (U/L) EN MUESTRAS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE, COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA: * P<0.05.....	60
GRÁFICA 16 EVALUACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE MDA (MMOL*100 MG DE TEJIDO) EN RIÑONES DE GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. PRESENTA DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA: * P<0.001.	61
GRÁFICA 17 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GSH (MMOL*250 MG DE TEJIDO) EN RIÑÓN DE GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. NO PRESENTAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.	62
GRÁFICA 18 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GSH (MMOL*250 ML) EN PLASMA EN GRUPOS DE INTOXICACIÓN AGUDA E INTERMITENTE COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL. NO PRESENTAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.	63

ACRÓNIMOS

Abreviatura	Significado
-------------	-------------

ADN	Ácido Desoximibonucleico
-----	--------------------------

ALT	Alanina aminotransferasa
-----	--------------------------

AST	Aspartato aminotransferasa
-----	----------------------------

ATP	Adenosin Trifosfato
-----	---------------------

Cln	Aclaramiento inulina
-----	----------------------

Cm	Centímetro
----	------------

CPAH	Aclaramiento acido para-amino hipúrico
------	--

dL	Decilitro
----	-----------

ECA	Enzima convertidora de angiotensina
-----	-------------------------------------

ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable.
-------	---

EPA	Enviromental Protection Agency, agencia del gobierno federal de Estados Unidos encargada de proteger la salud humana y proteger el medio ambiente: aire, agua y suelo.
-----	--

ERO	Especie Reactiva de Oxigeno
-----	-----------------------------

FDA	Food and Drugs Administration, agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos.
-----	---

g	Gramo
---	-------

GOD	Glucosa Oxidasa
-----	-----------------

GOT	Glutamato Oxaloacética Transaminasa
GPT	Glutámico Pirúvica Transaminasa
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
IARC	International Agency for Research on Cancer, órgano intergubernamental que forma parte de la Organización Mundial de la Salud de las Naciones Unidas.
IMR	Imágenes de resonancia magnética
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MDA	Malondialdehído
MDH	Malato Deshidrogenasa
Mg	Miligramo
Min	Minuto
mL	Mililitro
MN	Micro núcleos
MT	Micro túbulos
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NPs	Nanopartículas
Nm	Nanómetros
POD	Peroxidasa
POSS	Silsesquioxane oligomérico Poliédrico, sustancia química nano estructurada que tiende un puente entre la cerámica y materiales orgánicos.

Rpm	Revoluciones por minuto
SCE	Intercambio de cromátidas hermanas
SOD	Super oxido dismutasa
TGG	Gama-glutamil transpeptidasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
UV	Ultravioleta
WBCs	Hemocultivo humano



RESUMEN

Las nanopartículas de TiO_2 en la actualidad son de gran utilidad, se emplean dentro de la industria alimenticia hasta la metalurgia, pasando por la farmacéutica y cosmética, en la industria farmacéutica su uso se ha extendido como vehículo de fármacos quimioterapéuticos, sin embargo no existe mucha información acerca de los daños que puedan ocasionar una vez cumplido su objetivo. Es por eso que el objetivo de este estudio es evaluar los efectos hemodinámicos renales y proinflamatorios que tienen estas NP TiO_2 en ratas wistar macho, utilizando 2 modelos de intoxicación: aguda e intermitente (4 dosis); siendo evaluados a las 4 semanas. El grupo de intoxicación aguda se evaluó a las 24 h, 7, 14 y 28 días posteriores a la intoxicación de 5mg/Kg de peso del animal vía iv.; el grupo de intoxicación intermitente se evaluó el día siguiente a la 4ta. Intoxicación (5mg/Kg TiO_2 vía iv.) intoxicación semanal. Una vez terminado el periodo de intoxicación se realizó una cirugía mediante la cual se obtuvieron muestras de orina, plasma y tejido. Los resultados se analizaron mediante ANOVA y Tükey-krammer. Se encontró que las NP TiO_2 alteran la hemodinámica renal, afectando la filtración glomerular y el flujo plasmático renal, así como alteración en el manejo renal de Na, ambos grupos mostraron oliguria, se presentó una hiperglucemia en el análisis del grupo agudo a las 24 horas, se presentó glucosuria en el grupo agudo evaluado a los 28 días y en el grupo de intoxicación intermitente, se presentó una disminución en el C-Creatinina en el grupo agudo evaluado a los 28 días y en el intermitente, en el grupo intermitente se presentó la mayor actividad de TGG, MDA presento un incremento en el grupo agudo evaluado a los 7 días, el estudio histológico del grupo agudo mostró necrosis en células de túbulos proximales desde las 24 h, sin embargo al día 28 de evaluación se vio reparación tubular, el grupo intermitente se vio necrosis tubular, así como reparación tubular. El daño mostrado por el grupo agudo a los 28 días es similar al daño que muestra grupo de intoxicación intermitente en algunos parámetros.

ABSTRACT

TiO₂ nanoparticles are currently very useful, they are used within the food industry to the metallurgy, through the pharmaceutical and cosmetics, in the pharmaceutical industry its use has been extended as a vehicle of chemotherapeutic drugs, however there is not much information about the damages that they may cause once their objective has been achieved. That is why the objective of this study is to evaluate the renal and proinflammatory hemodynamic effects of these NPTiO₂ in male wistar rats, using 2 intoxication models: acute and intermittent (4 doses); being evaluated at 4 weeks. The group of acute intoxication was evaluated at 24 h, 7, 14 and 28 days after the intoxication of 5mg/Kg of weight of the animal via iv.; The intermittent intoxication group was evaluated the day after the 4th. Intoxication (5mg/Kg TiO₂ via iv.) Weekly intoxication. Once the period of intoxication was over, a surgery was performed through which samples of urine, plasma and tissue were obtained. The results were analyzed by ANOVA and Tukey-Kramer. It was found that NPsTiO₂ altered renal hemodynamics, affecting glomerular filtration and renal plasma flow, as well as alterations in renal Na administration, both groups showed oliguria, hyperglycemia occurred in the analysis of the acute group at 24 hours, glucosuria occurred in the acute group evaluated at 28 days and in the intermittent poisoning group, there was a decrease in C-Creatinine in the acute group evaluated at 28 days and in the intermittent group, in the intermittent group the higher activity of TGG, MDA showed an increase in the acute group evaluated at 7 days, the histological study of the acute group showed necrosis in cells of proximal tubules from 24 h, however on day 28 of evaluation tubular repair was seen, the Intermittent group tubular necrosis was seen, as well as tubular repair. The damage shown by the acute group at 28 days is similar to the damage shown by the intermittent intoxication group in some parameters.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 NANOPARTÍCULAS

Cuando las dimensiones de las partículas de un sólido son del tamaño entre 1 a 100 nanómetros, el nombre que reciben es de Nanopartículas. Las propiedades físicas de estas partículas son muy distintas de las que se observan en un sólido de tamaño normal o macroscópico con la misma composición química (Hernando, 2007). Hoy en día se utilizan de forma habitual técnicas que permiten fabricar, caracterizar y manipular partículas de este tamaño las cuales llamamos nanopartículas, NPs (Hernando, 2007).

Estas nanopartículas son producidas de forma natural (como resultado de incendios forestales, erupciones volcánicas, etc.), así como antropogénicamente, debido a la facilidad con la que estos nanomateriales entran en contacto con los sistemas biológicos (humano, animales vertebrados y especies útiles al humano), así como su presencia en disolución en recursos naturales útiles al humano (cuerpos de agua, aire, vegetación, suelo), se ha hecho consciente su posible efecto toxicológico para las especies anteriores (Frejo et al, 2011). La sorprendente combinación de nuevas propiedades físicas detectadas en diferentes tipos de NPs ha despertado una curiosidad investigadora comparable a la que ejerce el enorme panorama de posibles aplicaciones (Hernando, 2007).

Estas partículas presentan diferentes propiedades a nivel nanométrico que a escala no nanométrico, las cuales están relacionadas con su superficie, como son las propiedades eléctricas, mecánicas, magnéticas, ópticas así como químicas, estas propiedades juegan un papel importante en su toxicidad (Frejo et al, 2011).

1.1.1. CARACTERÍSTICAS

Las nanopartículas pueden clasificarse principalmente de acuerdo a su origen y sus dimensiones. Por su origen pueden clasificarse como naturales o antropogénicas. A su vez las nanopartículas antropogénicas se dividen por su naturaleza química (Cornejo, 2015).

Las nanopartículas producidas de forma natural pueden ser de origen biológico tales como virus y bacterias, de origen mineral, así como las presentes en el medio ambiente como aquellas que contienen el polvo de arena, niebla o derivados de la actividad volcánica e incendios forestales (EPA, 2016).

Las nanopartículas de origen antropogénico, pueden producirse por procesos industriales como pirolisis mediante el uso de llama de negro de carbono, procedimientos a altas temperaturas obteniendo humo de sílice así como partículas ultrafinas de óxido de titanio, procesos de combustión, entre otros (EPA, 2016).

Las NPs generadas por procesos de nanotecnología se han clasificado por la Agencia del Medioambiente de los EEUU en cuatro tipos:

- a) Nanopartículas basadas en carbono. Están formadas en mayor porcentaje de carbono y adoptan diversas formas geométricas, estos suelen tener forma de esfera hueca o fullerenos, elipsoides o tubos. A los fullerenos esféricos se les nombra también buckyesferas y los cilíndricos buckytubos o nanotubos. Estas NPs en el área de medicina se utilizan principalmente fijando antibióticos específicos en su estructura para así atacar bacterias y a ciertas células cancerígenas. Estas partículas al ser principalmente enlaces estables de grafeno no son muy reactivas, pero existen sustancias como el tolueno y el disulfuro de carbono que actúan como disolventes (Frejo et al, 2011; EPA, 2016).

- Fullerenos, están formados por al menos 60 átomos de carbono, estos están unidos entre sí por tres enlaces covalentes (uno doble y dos sencillos), los átomos están dispuestos en forma hexagonal, pentagonal o heptagonal. Su densidad es de 1.65 g/cm^3 y su diámetro varía entre 0.7 y 1.5 nm (Cornejo, 2015).
- Nanotubos, estas nanopartículas pueden tener de 100 a 1000 átomos de carbono, los cuales están dispuestos en una o varias capas concéntricas, son moléculas flexibles que cambian sus propiedades al deformarse su estructura cilíndrica (Cornejo, 2015).

b)

Nanopartículas basada en metales. Son aquellas nanopartículas formadas por diferentes metales, dentro de las cuales destacan las siguientes (Frejo et al, 2011; EPA, 2016):

- Óxido de bismuto, se utilizan principalmente para el aumento de la opacidad en rayos x.
- Óxido de cobre, tienen aplicaciones catalíticas y de protección, como en la conservación de la madera.
- Óxido de hierro, se utiliza en la industria cosmética y en la industria para aplicaciones catalíticas como la síntesis de amoníaco.
- Óxido de estaño, utilizado en aplicaciones catalíticas.
- Óxido de aluminio, utilizado para recubrimientos donde es necesario la transparencia, se utiliza para la incorporación en revestimiento, elevando la resistencia a la abrasión afectando mínimamente la claridad.
- Óxido de zinc, aprobado por la FDA para su uso como ingrediente activo en productos de cuidado personal.
- Dióxido de titanio, aprobado por la FDA para su uso como ingrediente activo en productos de cuidado personal, (cremas blanqueadoras, pastas dentales, etc.), son

utilizadas como aditivos en la industria para proporcionar mayor blancura a pinturas, plásticos, etc.

- c) Dendrímeros, son macromoléculas poliméricas sintéticas que generalmente son de distinta naturaleza química como péptidos, lípidos, polisacáridos; estos son polímeros ramificados, con una superficie dotada de numerosos extremos de cadena, por esto pueden desempeñar funciones químicas específicas. Los polímeros son considerados como una nueva generación de nanosistemas y debido a su susceptibilidad de ser utilizados como vehículos farmacológicos, han despertado interés, estos dendrímeros en farmacología son utilizados como agentes de contraste, sensores de diagnóstico, agentes descontaminantes, entre otros (Frejo et al, 2011; EPA, 2016).
- d) Compuestos o compositos, este tipo de nanomateriales tienen la capacidad de combinar nanopartículas con otras similares o de mayor tamaño, por ejemplo las nanopartículas de arcilla, las cuales cuando son añadidas a otros producto como piezas para automóviles y materiales de empaquetado, con esto mejoran las características mecánicas, térmicas, de protección, etc. de estos productos (Frejo et al, 2011; EPA, 2016).

El estado de agregación, la forma y las dimensiones espaciales de las nanopartículas son variables y como se ha dicho de gran influencia para sus propiedades. De acuerdo a su aspecto dimensional las nanopartículas pueden clasificarse en cuatro grupos, en la figura 1 se pueden observar ejemplificadas (Cornejo, 2015):

- a) Cero dimensional (0D). Presenta las tres dimensiones (x, y, z) en las cuales los electrones están confinados, <100 nm. Algunas de las nanopartículas en esta clasificación son: Fullerenos, partículas coloidales, nanoclusters, virus, proteínas, nanopartículas de Au y Ag (Cornejo, 2015).

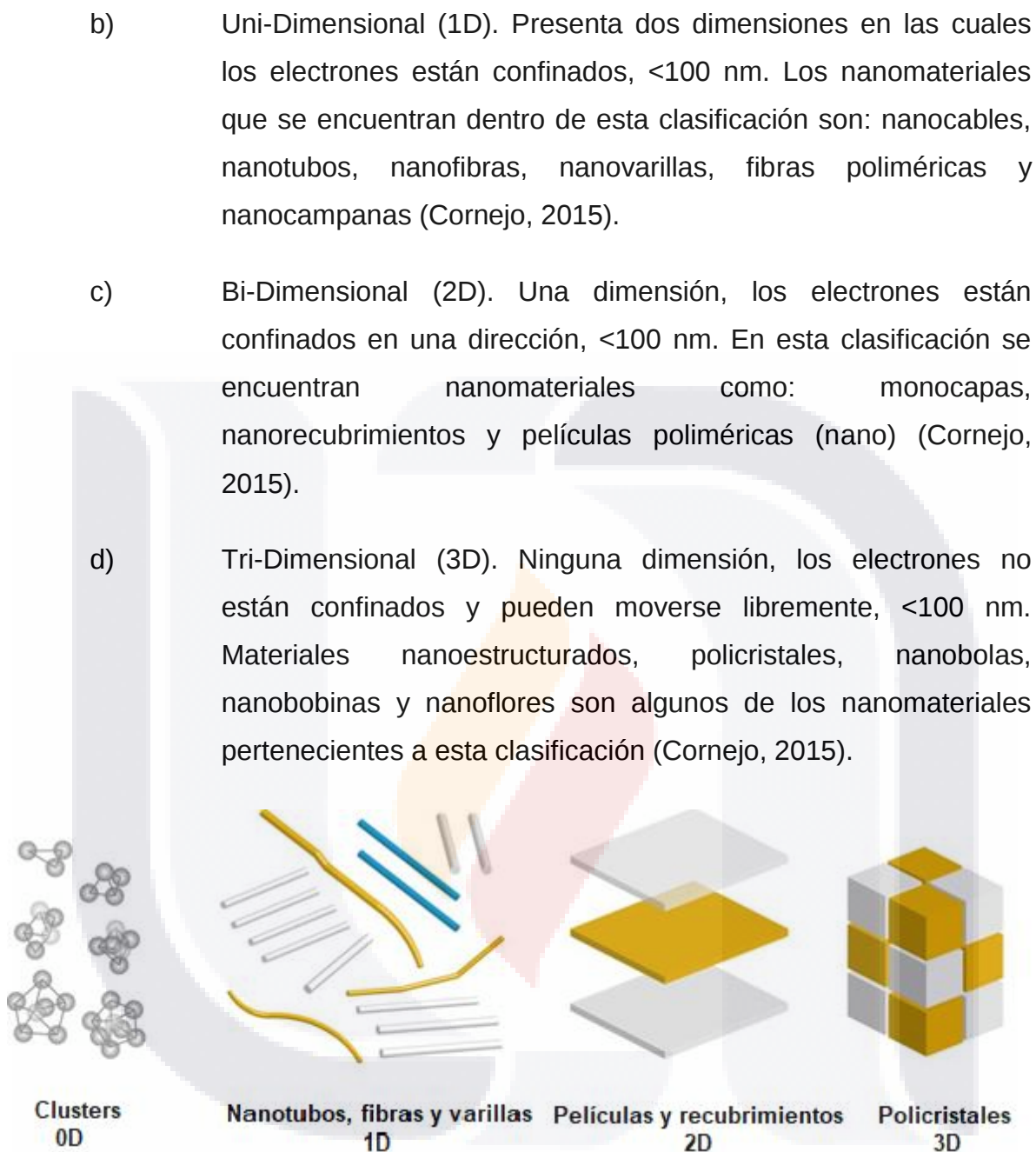


Figura 1 Clasificación de nanopartículas de acuerdo a su aspecto dimensional (Cornejo, 2015).

1.1.2. USOS Y APLICACIONES

Debido a las diferentes características y propiedades de las nanopartículas se han utilizado en diferentes áreas de aplicación (Gutiérrez-Wing, 2006). Paull et al. (2003) han evaluado el grueso de la inversión existente en la industria de nanotecnología, la cual tiene un enfoque al desarrollo de herramientas e instrumentos nanotecnológicos, calculando concentran el 4% de los fondos totales; desarrollo de nuevos materiales, 12% de los fondos totales; dispositivos novedosos por ejemplo sensores, con 32% de fondos totales; innovaciones nanobioteconológicas en las cuales incluyen nuevos medicamentos, procedimientos de diagnóstico, contando con el 52% de los fondos totales.

Países como Estados Unidos, Japón, China, Corea del Sur y algunos pertenecientes a la Unión Europea, han estado liderando el desarrollo de la nanotecnología. Se les considera líderes en el campo por destacar en la asignación de presupuesto gubernamental para fortalecer la investigación y desarrollo, la inversión aportada se concentra generalmente a la creación y desarrollo de los materiales y sus aplicaciones dejando de lado el estudio de las consecuencias que estos pueden generar a nivel del medio ambiente y a los seres vivos (Delgado, 2009).

Disciplinas como son medicina, ingeniería, informática, mecánica, física y química se han visto beneficiadas con el uso de productos nanotecnológicos. Algunas de las aplicaciones de la nanotecnología y de nanopartículas se explican a continuación (Medina, 2015):

- Medio ambiente. Utilización de filtros porosos a escala manométrica para eliminar virus y bacterias en agua. Desarrollo de tecnologías de separación electica para atraer iones de sales y metales pesados. Cerámicas de óxidos metálicos y TiO_2 para tratamientos de agua mediante foto-catálisis, NPs de metales preciosos para oxidar monóxido de carbono (Medina, 2015).
- Sector energético. Al surgir la necesidad de nuevas tecnologías para el desarrollo de energía sustentable y ecológicamente

amigable, se desarrollaron celdas solares como dispositivos para generar energía limpia. Se utilizan nanopartículas como TiO_2 , ZnO y Au para la creación de celdas solares sensibilizadas a color; nanopartículas híbridas metálicas para el almacenamiento de Hidrogeno, nanoarcillas para la realización de mejoras de materiales para ánodos y cátodos utilizados en pilas de combustibles, TiO_2 y Cerio como catalizadores ambientales, NPs cerámicas de óxidos metálicos (Cerio, Zirconio) y metales (Pt , Rh , Pd y Ru) como catalizadores en vehículos (Medina, 2015).

- Ingeniería. Se desarrollaron circuitos de cómputo para funcionamiento lógico así como transistores utilizando nanotubos semiconductores, con lo cual se logró un incremento en la velocidad, disminuyendo el consumo de energía. El desarrollo de nanotransistores y nanomemorias se ha vuelto crucial para absorber las necesidades de procesamiento de datos y la capacidad de memoria demandada. A continuación se mencionan algunas aplicaciones y nanopartículas utilizadas en esta área: ZrO_2 , Al_2O_3 , TaC , TiC y Co como aditivos en herramientas para cortar, NPs diversas como sensores químicos, NPs de alúmina y $\text{Y-Zr}_2\text{O}_3$ como recubrimientos resistentes a la abrasión, organoarcillas, silicagels y POSS como nanoarcilla polímero reforzado con materiales compuestos, NPs metálicas como ViO , AlO , CdO como pigmentos, NPs plata para tintas, conductores magnéticos, nanoarcillas, nano óxidos, nano hidróxidos de metales, TiO_2 , Y_2O_3 y SiO_2 para mejorar la estructura física de polímeros y materiales compuestos, nanoarcillas de bentonita y Kaolinita para barreras de embalajes, TiO_2 para vidrios autolimpiables (Medina, 2015).
- Agricultura y alimentos. En la actualidad se ha experimentado la nanoestructuración de nuevos agroquímicos para la producción agroindustrial. Se ha hecho un avance en el diseño de materiales

funcionales para plásticos inteligentes especiales para el embalaje de los productos (Medina, 2015). En la industria de los alimentos procesados, las nanoaplicaciones son diversas. Se enlistan desde el empaquetamiento inteligente, hasta el nanodiseño de conservadores, nutriceuticos (vitaminas, etc.) y otros aditivos para la elaboración de alimentos "a la medida" del consumidor (Delgado, 2009).

- Medicina. Las aplicaciones nanotecnológicas que son más prometedoras y dinámicas son aquellas que se desarrollan en el sector salud, entre las más destacadas son para enfermedades como cáncer, VIH sida, diabetes, enfermedades degenerativas, cardiovasculares y nerviosas. Algunas de las nanopartículas utilizadas son hidroxiapatita cerámica (HAp) como promotor de crecimiento óseo, ZnO y TiO₂ como aditivos en protectores solares, Ag en apósitos para heridas antibacterianas, NPs Cu₂O como agentes fungicidas, NPs de plata y coloides de oro son utilizadas como biomarcadores y detección, óxidos de hierro como Fe₃O₄ y Fe₂O₃ como agentes de contraste de IMR (Imágenes de Resonancia Magnética) (Medina, 2015).
- Otros. La utilización de NPs para la creación de prendas de ropa dinámicas, en artículos de cuidado personal como en shampoos, pastas dentales, maquillaje han aumentado la exposición a estas (Medina, 2015).

Se pretende que nanopartículas metálicas transporten moléculas como ácidos nucleicos, aminoácidos, azúcares o ADN enlazadas a los átomos de la superficie y que puedan viajar por el organismo hasta depositarse en dianas bien definidas. En su lugar de anclaje liberarían las moléculas transportadas dando lugar a una quimioterapia selectiva que reduciría al máximo los efectos colaterales (Hernando, 2007).

Las nanopartículas magnéticas son de sumo interés en biomedicina por sus diversas e importantes aplicaciones: i) para transporte de drogas terapéuticas o de radioisótopos, ii) como separadores magnéticos de células marcadas, iii) para el catabolismo de tumores vía hipertermia, y iv) como agentes de contraste en aplicaciones de resonancia magnética (Hernando, 2007).

1.2. DIÓXIDO DE TITANIO

Se han identificado en la naturaleza en tres formas tridimensionales de dióxido de titano (TiO_2): rutilo (estructura tetragonal), anatasa (estructura octahédrica) y brookita (estructura ortorrómbica) (Figura 2) (Feltrín et al, 2013). El dióxido de titanio en formas rutilo y anatasa se producen industrialmente en grandes cantidades y se utilizan como pigmentos y catalizadores y en la producción de materiales cerámicos. El dióxido de titanio tiene gran importancia como pigmento blanco por sus propiedades de dispersión y su estabilidad química. El dióxido de titanio es el pigmento inorgánico más importante en términos de producción mundial (Quiminet, 2006).

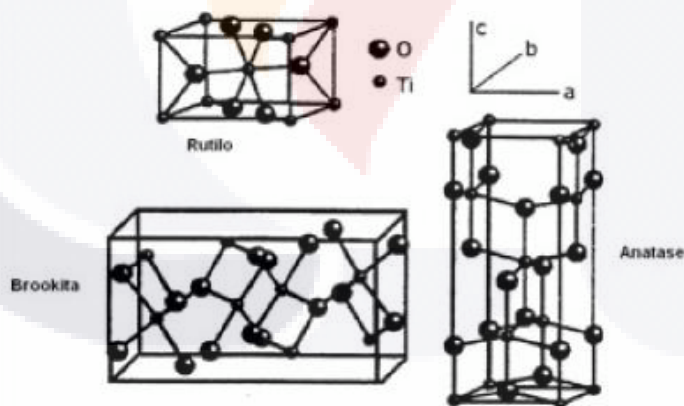


Figura 2 Forma tridimensional de las NPs de TiO_2 : Rutilo, Anatasa y Brookita (Feltrín et al, 2013).

El TiO_2 es un polvo blanco incombustible e inodoro con un peso molecular de 79.9 g/mol, una densidad de 3.9 - 4.3 g/cm³, punto de ebullición y fusión de 2500-3000 °C y 1855 °C respectivamente, este compuesto es un material particulado poco soluble en agua. (INSHT, 2010). Sager et al (2008) reportaron en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

células de los alveolos pulmonares de rata, la capacidad de la forma anatasa de inducir en mayor grado que la forma rutilo la formación de EROs, sin embargo, las EROs generados por TiO_2 anatasa no se producen bajo condiciones de luz ambiente, si no al ser irradiadas por luz UV.

En febrero de 2006 la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer cambio la clasificación del dióxido de titanio (TiO_2) determinándolo como posible carcinógeno para los seres humanos (Grupo 2B) esto debido a la evidencia obtenida en animales de experimentación y evidencia inadecuada de estudios epidemiológicos (IARC, 2011).

En 2008 se realizó una investigación en la distribución y la toxicidad de las NPs de TiO_2 en una situación de 100% de biodisponibilidad, en cuyos experimentos se determinaron contenido de TiO_2 en tejido, parámetros bioquímicos y antígenos en suero para determinar cambios patológicos. No se encontraron niveles detectables de TiO_2 en células sanguíneas, plasma, cerebro o ganglios linfáticos, pero si encontraron en hígado, bazo, pulmón y riñón, encontrando en hígado la mayor concentración y en riñón la menor; no se encontró cambio en las enzimas medidas en muestras de sangre, no mostrando efectos tóxicos obvios, aun existiendo una biodisponibilidad del 100% administrado por vía intravenosa, concluyeron que estas NPs podrían utilizarse de forma segura en dosis bajas (Fabian et al, 2008).

1.2.1. TOXICOCINÉTICA

Las nanopartículas de dióxido de titanio como ya se ha enumerado tienen un amplio uso. El pequeño tamaño que presentan facilita su absorción en las células epiteliales que forman las barreras biológicas de las vías clásicas de exposición (piel, mucosas respiratorias y digestiva), facilita también su paso hacia el torrente sanguíneo y la circulación linfática y desde estas hasta los diferentes sistemas de órganos del cuerpo como sistema nervioso central (Zahra et al, 2008), órganos como hígado, bazo y pulmón en donde se ha encontrado la formación de

depósitos y su acumulación (Hasan et al, 2007). A continuación se muestra en la Figura 3 el modelo toxicocinético de las NPs de TiO_2 , publicado por Shi et al (2013):

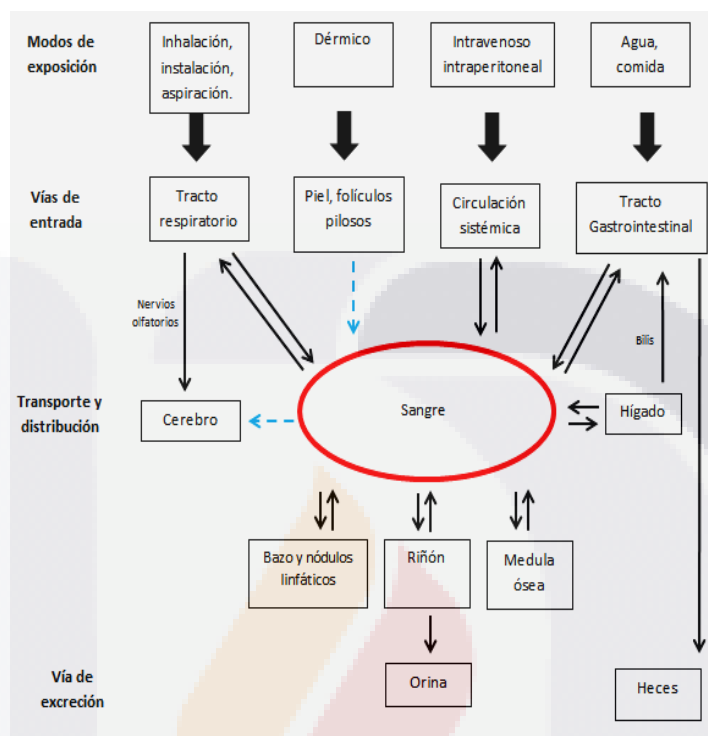


Figura 3 Toxicocinética de nanopartículas TiO_2 . Se muestra las diferentes rutas de exposición y vías de entrada de las NPs de TiO_2 , así como sus rutas de transporte y distribución por los diferentes órganos y sistemas, se muestra las alternativas de eliminación de estas NPs (Shi et al, 2013).

El uso generalizado y desmedido de materiales confeccionados con NPs TiO_2 , así como la facilidad con la que entran y se distribuyen en los sistemas de órganos del cuerpo de los seres vivos con los que entran en contacto, permite suponer que dichos nanomateriales representan un alto riesgo para su salud (Long et al, 2007).

1.2.2. TOXICODINÁMICA

Aunque falta mucho por dilucidar el mecanismo de la toxicidad de las NPs, existen reportes acerca de su efecto sobre la integridad estructural y funcional de las membranas celulares, consecuentes al daño oxidativo ocasionado a macromoléculas como proteínas y fosfolípidos, componentes de las mismas. Se han reportado además efectos genotóxicos relacionados con la fragmentación del ADN, efectos sobre la cadena respiratoria, así como la activación de vías intracelulares de señalización, asociadas con el proceso inflamatorio. A continuación se describen algunos de los mecanismos de toxicidad que puede presentar el dióxido de titanio (Gutiérrez, 2009):

- Toxicidad pulmonar: Los efectos de las NPs sobre las vías respiratorias son las más estudiadas, esto se debe a que es una ruta de exposición principal. Se le ha atribuido a las NPs de TiO_2 la producción de estrés oxidativo y la liberación de mediadores de inflamación. Estas NPs en estudios in vivo realizados en roedores expuestos por instilación intratraqueal, ha demostrado inducir lesiones pulmonares como infiltración de células inflamatorias, fibrosis y ensanchamiento de intersticios, aumentando su gravedad a menor tamaño de la NPs (Gutiérrez, 2009).
- Mecanismo de genotoxicidad relacionado principalmente con el tamaño de las partículas y el área superficial. Los datos de genotoxicidad son importantes para la regulación de la nanotecnología y la evaluación del riesgo. Recientemente, la genotoxicidad de NPs TiO_2 ha sido intensamente estudiada debido a su carcinogenicidad. Se ha publicado en gran número de informes sobre la genotoxicidad del NPs TiO_2 y de sus mecanismos adyacentes, sin embargo no hay artículos específicos sobre su mecanismo de genotoxicidad los NPs TiO_2 .

Recientemente se ha demostrado que las propiedades fisicoquímicas del TiO_2 juega un papel importante en su toxicidad (Srivastava et al, 2013). La distribución que tienen las NPs a través de diversos órganos y tejidos en los cuales pueden llegar a acumularse y como consecuencia dañar estos sistemas de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

órganos, esto debido a la sensibilidad que presentan al estrés oxidativo generado por las NPs. Las EROs generadas por la interacción de las NPs TiO_2 con los sistemas biológicos, son responsables del estrés oxidativo (Long et al, 2007), así como de la peroxidación lipídica, la cual causaría daños celulares (Figura 4) (Srivastava et al, 2013).

Se encontró que las NPs de TiO_2 al entrar a la célula no se une a la membrana de esta, por lo que puede tener acceso directo a proteínas intracelulares, organelos e incluso al material genético, debido a esto el potencial tóxico existente puede verse incrementado (Hasan et al, 2007). Se ha encontrado y demostrado que las alteraciones patológicas que aparecen al inducir una exposición de estas NPs pueden asociarse a la generación de radicales hidroxilo, de acuerdo a lo anterior, los antioxidantes endógenos (eliminadores de radicales hidroxilo), no podrían prevenir el daño causado por el TiO_2 a las diferentes biomoléculas (Hasan et al, 2007).

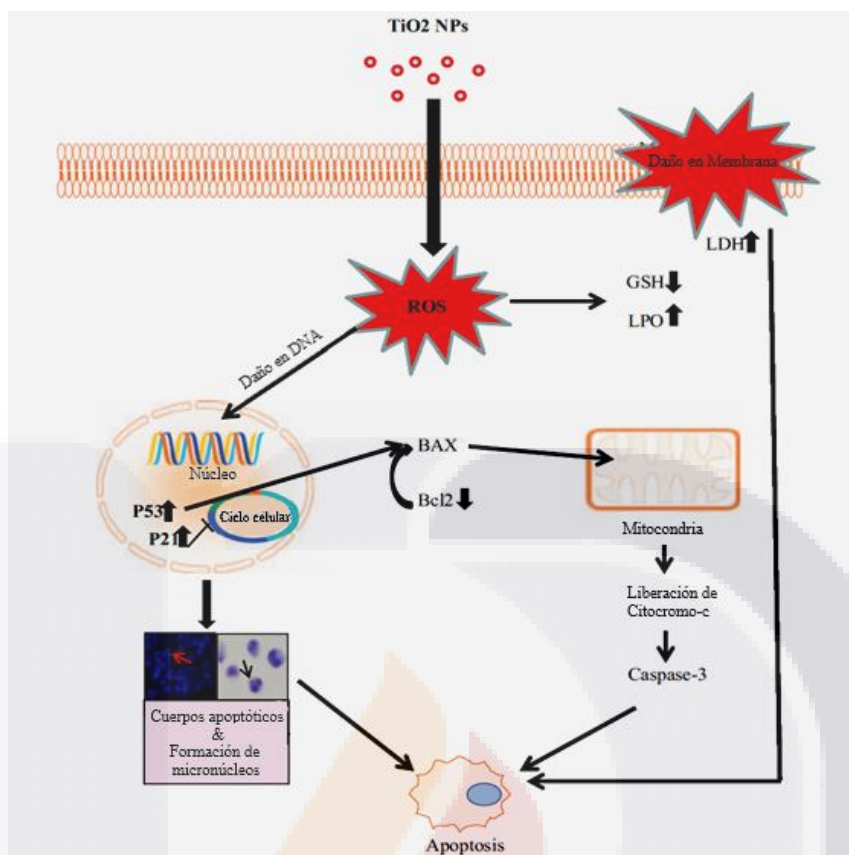


Figura 4 Toxicodinámica de las NPs de TiO_2 . Las nanopartículas de TiO_2 atraviesan la membrana celular, el estrés oxidativo producido por estas moléculas genera radicales libres que disminuyen los antioxidantes endógenos como el glutatión al mismo tiempo que aumentan la lipoperoxidación dañando las membranas de organelos y activan los mecanismos inductores de apoptosis o induciendo a necrosis celular (Srivastva et al, 2013)

1.3. RIÑÓN

Los riñones son considerados como los órganos excretores por excelencia, son los órganos encargados de regular la composición del plasma sanguíneo y del líquido intersticial a través de la depuración o limpieza consistente en la eliminación del compuesto tóxicos derivados del metabolismo celular y la formación de orina. Como funciones secundarias realiza: colabora con el sistema respiratorio mediante el control del pH; tienen función metabólica ya que es un órgano capaz de realizar la gluconeogénesis; al sufrir hipoxia segrega una

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hormona glicoprotéica llamada eritropoyetina, la cual estimula la producción de eritrocitos, estimulando el proceso de eritropoyesis; contribuye en la activación de vitamina D, cuya función es incrementar la absorción de calcio y fosforo a nivel intestinal (aumentando el nivel de Ca en sangre); funciona como regulador de la presión arterial: a largo plazo mediante la filtración glomerular y a corto plazo mediante el sistema renina-angiotensina-aldosterona, el cual además de regular la presión arterial, regula volumen extracelular corporal así como el balance de sodio y potasio, la renina es secretada por células yuxtaglomerulares del riñón, la cual cataliza la conversión de angiotensinógeno (glicoproteína secretada en hígado) a angiotensina I, esta mediante la enzima convertidora de angiotensina (ECA) la convierte a angiotensina II, cuya acción es liberar aldosterona por la corteza de la glándula suprarrenal (Ramón, 2006; Gómez, 2014).

1.3.1.FISIOLOGÍA

A nivel macroscópico podemos decir que los riñones se localizan en el retroperitoneo a nivel de las costillas inferiores, la posición del riñón derecho es más baja debido a la posición del hígado. En la cara interna se encuentra una depresión denominada *el hilio*, punto de entrada y salida de los vasos sanguíneos (arterias y venas renales) y de los conductos excretores (los uréteres). Los uréteres conectan con la vejiga y uretra (Figura 5) (Ramón, 2006; Gómez, 2014).

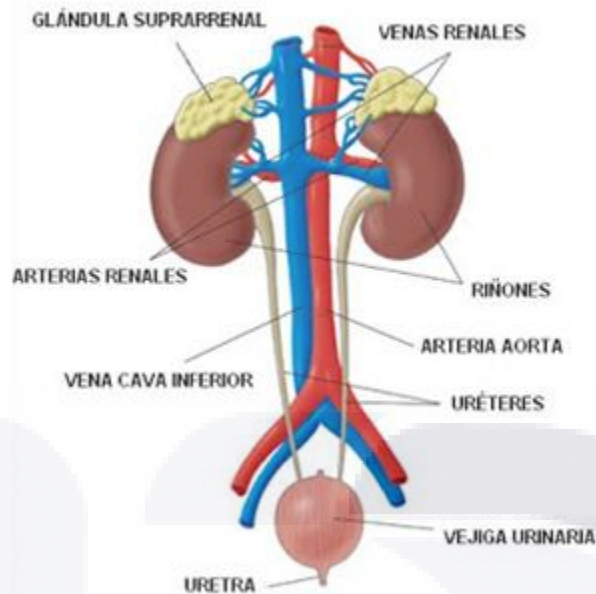


Figura 5 Anatomía a nivel macroscópico del sistema renal. (Tomado de Ciencias Biológicas 2008 <http://hnnncbiol.blogspot.com>)

El hilio renal está limitado por dos labios y continua con una cavidad llamada seno renal, el cual se extiende hacia el interior, en esta zona como ya se mencionó discurren los vasos sanguíneos, nervios renales y el extremo terminal superior del uréter, el cual tiene forma de embudo y se le llama pelvis renal. El seno renal está relleno por tejido fibroadiposo y las paredes por tejido conjuntivo de la cápsula renal. La pelvis del uréter se divide en dos o tres ramas conocidos como cálices mayores y estos se dividen en cálices menores, existen de siete a catorce cálices menores, estos cálices acoplan de una a tres papilas renales, los vértices de cada papila renal desembocan los tubos colectores mayores. Al observarse un corte hemiseccionado de riñón se pueden apreciar dos zonas fácilmente distinguibles: corteza (externa) coloración rojo-pardo, médula (interna) más pálido. La corteza renal forma arcos de tejido, situados debajo de la capsula, surgen proyecciones que se sitúan entre las unidades de la medula, las cuales son llamadas columnas de Bertín. Se pueden visualizar estriaciones en la corteza las cuales se conocen como rayos medulares; la medula renal está formada por

conos denominadas pirámides medulares, cada vértice se dirige al sistema calicial constituyendo una papila (Figura 6) (Hernando et al, 2008; Gómez, 2014)

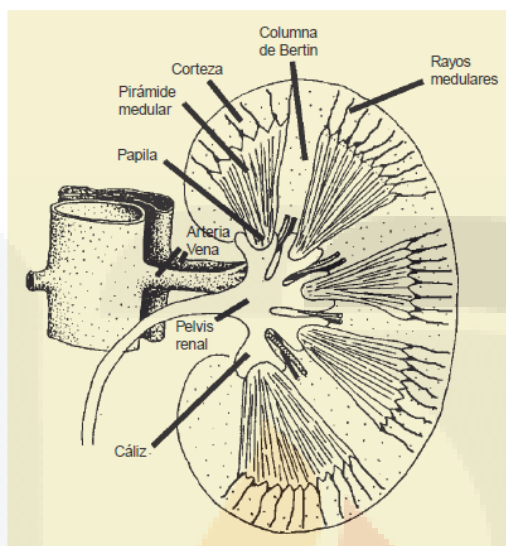


Figura 6 Esquema de un corte sagital del riñón, pelvis renal y vasos aferentes (Gómez, 2014).

Debido a la funciones que realizan los riñones, es comprensible que necesiten una gran vascularización; el flujo sanguíneo renal es de aproximadamente 1200 ml/min, los vasos sanguíneos se reparten de forma específica. Por lo que es esencial conocer la distribución vascular para comprender la histología y la fisiología renal. La arteria renal alcanza al riñón por el hilum y se ramifica en dos, una anterior y otra posterior, estas antes de penetrar en el tejido renal, se dividen en varias arterias segmentarias. Una vez en el parénquima renal se originan las arterias interlobulares, que discurren por las columnas de Bertín hasta la base de las pirámides, donde dan lugar a las arterias arciformes, las arterias arciformes emiten ramas denominadas arterias interlobulillares que ascienden por la corteza. A partir de estas se originan las arteriolas aferentes, cada una de las cuales irriga un solo glomérulo. Al entrar en el corpúsculo renal, la arteriola aferente se divide en cinco a ocho ramas cortas, cada una origina un segmento capilar independiente. En conjunto constituyen el

penacho glomerular, es en esta zona donde se realiza la ultrafiltración del plasma sanguíneo (Gómez, 2014; Hernando et al, 2008).

Los capilares glomerulares drenan hacia la arteriola eferente, mediante la cual, la sangre abandona el glomérulo. Esta arteriola eferente, al abandonar el corpúsculo renal se ramifica en otra red de capilares que discurre por el intersticio en íntimo contacto con los túbulos renales, lo que va a permitir el proceso del paso a la sangre de sustancias reabsorbidas por las células tubulares. En la circulación cortical del riñón existen dos redes capilares, una glomerular y otra peritubular, consecutivas y unidas entre ellas por una arteriola. Las arteriolas eferentes, que proceden de corpúsculos yuxtamedulares, emergen entre 12 y 25 capilares que descienden hacia la médula, siguiendo un largo trayecto entre los componentes tubulares medulares denominados vasos rectos descendentes. Estos se ramifican en forma de malla, alrededor de ramas de asas de Henle y túbulos colectores, contribuyendo al intercambio de líquidos e iones que tiene lugar en la médula (Figura 7). Las terminaciones capilares convergen hacia los vasos rectos ascendentes que siguen un trayecto paralelo y opuesto a los descendentes, hasta desembocar en el sistema venoso (Hernando et al, 2008, Hall et al, 2011).

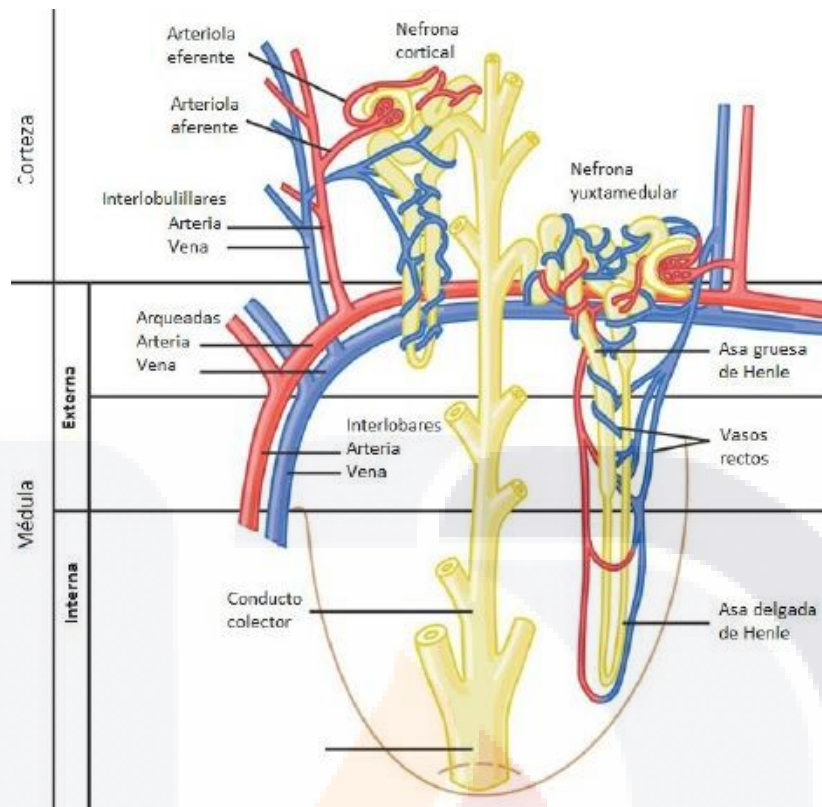
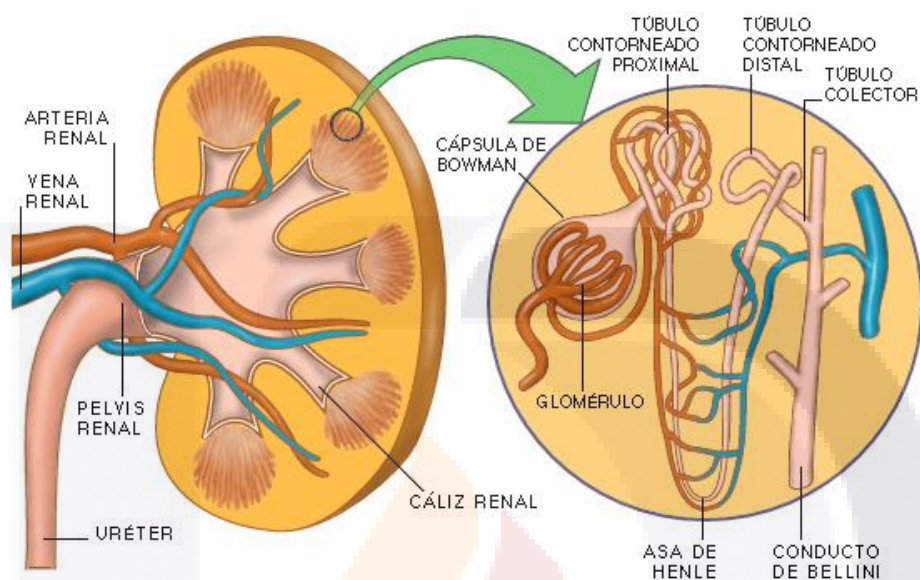


Figura 7 Esquema de la nefrona y la vascularización renal (Hall et al, 2011).

La unidad funcional del riñón es la nefrona. En un adulto existen de 1.5 a 2 millones de nefronas en la corteza renal, se pueden distinguir dos componentes principales: el glomérulo renal y el sistema tubular. Las nefronas aparecen en la corteza renal denominándose lobulillo renal que está constituido por la subunidad de corteza comprendida entre dos arterias interlobulillares centrado por un rayo medular que es surcado por un conducto colector principal que desciende hacia las pirámides, recibiendo la orina concentrada en las nefronas situadas a ambos lados del rayo medular. Son reconocidas cuatro subdivisiones de la porción tubular de la nefrona: el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal y los túbulos colectores (Figura 8). El extremo ciego de la porción proximal del sistema tubular aparece invaginado, para formar una estructura hueca, denominada cápsula de Bowman, donde está ocupada por el ovillo capilar glomerular. Esta estructura es llamada corpúsculo renal, ya que el glomérulo está constituido solamente por el ovillo capilar y sus elementos

asociados. Sin embargo, el uso del término glomérulo para referirse al corpúsculo entero está ampliamente difundido; junto al sistema tubular, completa la nefrona (Ramón, 2006; Hernando et al, 2008).



**Figura 8 Conformación de la Nefrona (Tomado de Proyecto Biosfera 2013
<http://recursos.cnice.mec.es>)**

La nefrona realiza 4 funciones principales, mediante la cual como ya se mencionó contribuye al equilibrio osmótico, ácido, formación de orina, etc.; Filtración, reabsorción, secreción y excreción. Para conocer las cantidades que aparecen en la orina es necesario sumar el filtrado a lo secretado y restarle la reabsorción, es decir: $\text{Volumen orina} = \text{Filtrado} + \text{Secretado} - \text{Reabsorción}$. Como ya se dijo la filtración se realiza en el glomérulo, el filtrado proviene del plasma a partir de la arteriola aferente la cual transporta la sangre sistémica, pasa a través de los capilares glomerulares donde se realiza la filtración de esta, una vez filtrada pasa del glomérulo a la arteriola eferente. El producto filtrado pasa de los capilares glomerulares hacia el túbulo proximal, la filtración es un proceso poco selectivo y es en el túbulo proximal principalmente donde se lleva a cabo la mayor reabsorción de iones que fueron filtrados, es también a lo largo de los túbulos que se continua llevando a cabo tanto la reabsorción (paso de sustancias desde los túbulos hacia capilares peritubulares) como la secreción de diferentes sustancias

(paso desde capilares peritubulares hacia la luz tubular) que son necesarias para eliminarse y conformaran la orina, mientras más tarde se secreten será más fácil su eliminación (Figura 9) (Ramón, 2006; Gómez, 2014).

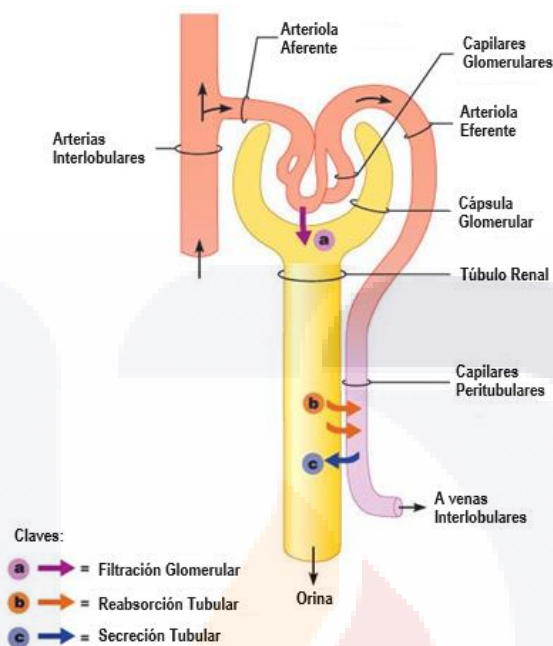


Figura 9 Proceso de filtración glomerular, reabsorción, secreción y excreción (Gómez, 2014).

1.4. ESTRÉS OXIDATIVO

Se conoce como estrés oxidativo al desequilibrio que aparece a nivel celular originado por el aumento de radicales libres y/o disminución de los antioxidantes endógenos, con el paso del tiempo este desequilibrio entre radicales libres y antioxidantes puede causar daños a diferentes niveles estructurales (Tetteh et al, 2012). En los últimos años ha tomado importancia el estudio del estrés oxidativo y de los radicales libres, en áreas como medicina, química, biología y física, esto con el fin de conocer a profundidad los mecanismos de autocontrol celular, así como mejorar la calidad de vida del ser humano y conocer la formación de enfermedades (Corrales, 2012).

Diversas patologías gástricas, cardíacas, respiratorias, óseas, multiorgánicas, etc.; han resultado de la evolución de alteraciones morfo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fisiológicas celulares, debido a la excesiva producción de moléculas de gran inestabilidad llamadas radicales libres, el estrés oxidativo se caracteriza por generar un desequilibrio entre la generación y eliminación de especies reactivas de oxígeno (ERO) disminuyendo los niveles de antioxidantes celulares (Corrales, 2012).

Los radicales libres son moléculas que pueden existir de forma independiente conteniendo en su última orbita uno o más electrones desapareados, otorgando un carácter paramagnético, tornándolos inestables y altamente reactivas con capacidad para combinarse con diferentes moléculas integradoras de la estructura celular y sus derivados. Por su configuración electrónica estos radicales tienen una vida media corta. Diversos estudios han demostrado que su reactividad esta correlacionada inversamente con su vida media y su capacidad de difusión. Los radicales libres se pueden formar a partir de la adición de un electrón a una molécula estable, una vez formados buscan estabilizarse electrónicamente reaccionando mediante mecanismos redox, transfiriendo electrones a otras moléculas participantes y causando más radicales libres (Morrisey, 1998).

Dentro de sus investigaciones algunos autores han clasificado a los radicales libres de acuerdo al grupo funcional presente, siendo estos: bromo, nitrógeno, tioles, fosforo, oxígeno, cloro; siendo los radicales libres de oxígeno reactivo los más comunes y de mayor relevancia en procesos aerobios; al ser el oxígeno un elemento imprescindible para la vida, utilizado para la generación de energía a partir de nutrientes, mediante la liberación de ATP (Gutierrez, 2002).

A través de diferentes estudios se encontró que el oxígeno puede llegar a ser toxico a concentraciones altas (arriba de niveles atmosféricos), estos efectos tóxicos desencadenarían daños reversibles como irreversibles causando muerte celular, al sufrir el oxígeno una reducción parcial se obtienen las especies reactivas de oxígeno (EROS), estas al alterar el equilibrio entre antioxidantes y sustancias pro oxidantes genera el estrés oxidativo y desencadenar procesos patológicos (Figura 10) (Corrales, 2012; Perón, 2001; Morrissey, 1998).

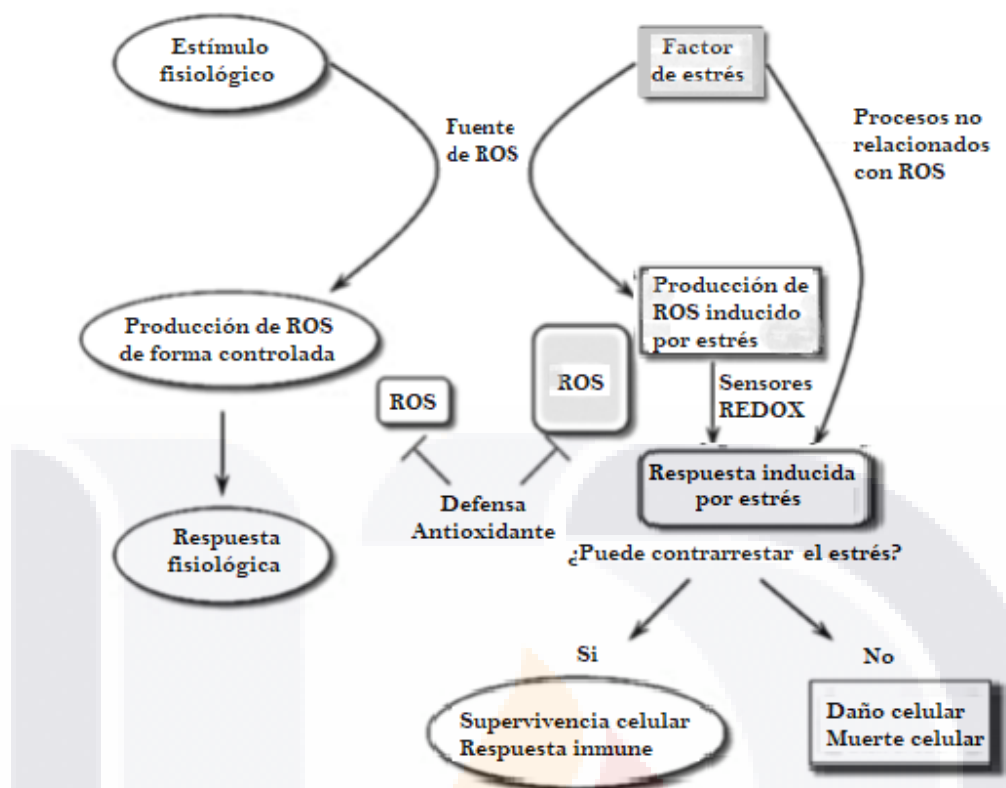


Figura 10 Respuesta celular frente a la formación de EROS a través de estímulos fisiológicos (Pourova et al 2010).

Cuando el oxígeno oxida un compuesto se ve reducido, al adicionar un electrón al oxígeno estando en su estado fundamental se forma el anión superóxido (O_2^-), si se vuelve a reducir se convertirá en anión peróxido (este no es un radical libre), cuando se da una reducción parcial del oxígeno por aceptación de dos electrones se forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2) contando con un enlace débil O-O rompiéndose y formando el radical hidroxilo considerado un radical altamente reactivo; sin embargo, cuando el oxígeno acepta cuatro electrones se forma una molécula de agua, en la figura 11 se puede observar el proceso de producción de ERO (Kehrer, 1993; Gutierrez, 2002).

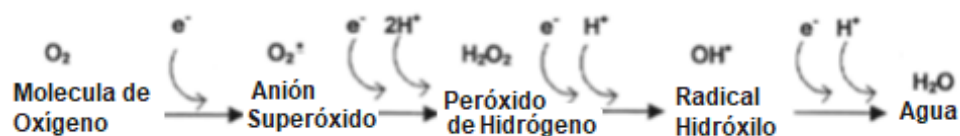


Figura 11 Esquema de producción de las especies activas de oxígeno (Meneghini, 1987).

Los organismos desarrollaron sistemas de defensa antioxidante para neutralizar las especies reactivas a las que este expuesto. Los antioxidantes son sustancias que retardan o previenen la oxidación de biomoléculas como ADN, lípidos, proteína, etc. Este sistema de defensa se forma por elementos enzimáticos como no enzimáticos, que actúan en conjunto para proteger a las células. Los elementos enzimáticos se convierte en primera defensa para el exceso de radicales libres; dentro de estos se encuentran las siguientes (Borella, 2004):

- Superóxido dismutasa (SOD). Cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , que puede ser degradado por catalasas o la glutatión peroxidasa, esta enzima tiene 4 isoformas: SOD1, SOD2, SOD3 y SODFe.
- Catalasa. Hemoproteína, se encuentra en los peroxisomas y mitocondrias principalmente, cataliza la descomposición del peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno.
- Glutatión peroxidasa (GPx), selenoproteína, en presencia de GSH actúa como agente reductor, cataliza la reducción del peróxido de hidrogeno y otros hidroperóxidos orgánicos y otros hidroperóxidos orgánicos a agua y alcohol, presenta 3 isoformas: GSH – Px celular (reduce el peróxido e hidrogeno e hidroperóxidos orgánicos libres, convirtiéndolos a agua y alcohol; GSH –Px plasmática; GSH –Px fosfolípido hidroperóxido, protege contra la lipoperoxidación, previene la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad; GSH- Px

gastrointestinal, reduce los hidroperóxidos lipídicos (Borella, 2004).

Los antioxidantes no enzimáticos se caracterizan por ser un conjunto de moléculas hidrófobas e hidrofílicas, cuya función es capturar los radicales libres y generar moléculas menos nocivas (Borella, 2004). Algunos de esto son:

- Vitamina C a nivel intra y extra celular, actúa sobre los radicales superóxido, hidroxilos (Borella, 2004).
- Glutación, tripéptido que presenta una distribución tisular variable, actúa sobre peróxido de hidrogeno, superóxido (Borella, 2004).
- Flavonoidespolifenolicos, incluye un amplio grupo de compuestos fenólicos que actúan como quelantes de metales y que además capturan la forma in vitro ERO (Borella, 2004).

Se han implementado técnicas que permiten evaluar el daño causado por los radicales libres y la actividad de diversos parámetros para evaluar el estrés oxidativo como: evaluación de proteínas mediante las técnica de Lowry y Bradford, quimioluminiscencia, sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS), actividad de SOD, determinación de catalasa, determinación de la enzima Glutation peroxidasa, medición de la glutación S-transferasa, cuantificación de glutación y determinación de nitritos y nitratos (Lozada et al 2009; Yu, 1994).

El estudio de los mecanismos de producción de estrés oxidativo, a través de diferentes métodos de laboratorio y de experimentación animal, han sido la base para diseñar estrategias terapéuticas que ayuden a mantener y recuperar el equilibrio entre sustancias oxidantes y pro oxidantes, para así evitar el progreso y desarrollo de patologías asociadas a este proceso (Lozada et al, 2009).

2. ANTECEDENTES

Como se ha planteado anteriormente las NPs de TiO_2 se usa ampliamente en áreas industriales, cosméticas, farmacéuticas, pinturas y en la producción de papel. No obstante que ha ido en aumento el uso de las NPs TiO_2 han ido en aumento y se está generalizando existe poca información sobre la toxicidad en los seres humanos. En el año 2011 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado el dióxido de titanio como “posiblemente carcinogénico para los seres humanos”, esta clasificación fue basado en estudios que indicaron un aumento de tumores de pulmón en ratas relacionadas con la inhalación de dióxido de titanio, sin embargo estudios realizados en trabajadores de la industria que manejan dióxido de titanio, en los cuales no sugieren una relación entre la exposición ocupacional al dióxido de titanio y un mayor riesgo de cáncer en los seres humanos (ACC, 2017).

En un estudio realizado por Koeneman et al (2010) investigaron las posibles vías por las cuales las nanopartículas de TiO_2 podrían cruzar la capa del epitelio, este estudio presenta como evidencia que a concentraciones mayores a $10 \mu\text{g/mL}$ las NPs de TiO_2 atraviesan el revestimiento epitelial del modelo intestinal por transición aunque a nivel bajo, las NPs de TiO_2 fueron capaces de penetrar a través de las células sin interrumpir los complejos de unión mediada por la γ -catenina, determinaron que a concentraciones de $10\text{-}100 \mu\text{g/mL}$ las NPs de TiO_2 no alteraban la integridad epitelial, sin embargo comienza una alteración tanto de la organización microvillar, de la superficie apical del epitelio pero inducen un aumento en el calcio intracelular libre.

Por otro lado, en el año 2007 se realizó un estudio en la Universidad Atatürk en Turquía donde se analizaron los efectos genotóxicos del TiO_2 relacionados con estrés oxidativo en hemocultivos humanos (WBCs), la sangre fue procesada para examinar marcadores de estrés oxidativo como glutatión, peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa y catalasa, así como la frecuencia en el intercambio de cromátidas hermanas (SCEs) y micronúcleos (MN), los cuales

funcionan como criterios de valoración genéticos de daño. Se realizó la evaluación utilizando concentraciones de 1, 2, 3, 5, 7.5 y 10 μM de TiO_2 , los resultados arrojados indicaron que había una posibilidad de inducir efectos genotóxicos al verse aumentada la frecuencia de SCE y MN, sin embargo se observó que los tratamientos con TiO_2 promovieron el estrés oxidativo disminuyendo la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa en los hemocultivos, por lo cual se pueden asociar los daños genotóxicos en ADN mediado por estrés oxidativo (Türkez et al, 2007).

Diferentes estudios han demostrado los riesgos de las NPs TiO_2 en el sistema neuronal y otros órganos presentes. Las NPs de TiO_2 pueden entrar no sólo a las células, sino también a las mitocondrias y los núcleos. Por lo tanto estas partículas pueden interactuar con proteínas citoplasmáticas tales como microtúbulos (MTs). MTs son proteínas del citoesqueleto que son esenciales en las células eucariotas para una variedad de funciones, tales como el transporte celular, la motilidad celular y la mitosis. MTs en las neuronas se utilizan para el transporte de sustancias como los neurotransmisores. En el citoplasma las NPs TiO_2 pueden interactuar con estas proteínas y afectar sus funciones cruciales en diferentes tejidos. Se demostraron los efectos de NPs TiO_2 en polimerización y estructura de MTs utilizando espectrofotometría ultravioleta y fluorometría. La espectroscopia fluorescente mostró un importante cambio de conformación de tubulina en la presencia de NPs TiO_2 y los resultados de la espectroscopia ultravioleta mostraron que los NPs de TiO_2 afectan la polimerización de tubulina y la disminuyen (Naghdi et al, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

La exposición a NPTiO_2 en el ambiente laboral y durante el tratamiento con nanofármacos que las emplean como vectores, puede generar efectos nocivos en diversos órganos, incluyendo los riñones. Estos órganos multifuncionales realizan procesos vitales, por lo que cuando son afectados por xenobióticos pueden desencadenarse patologías graves como la falla renal aguda o crónica.

Existen pocos estudios enfocados en dilucidar los efectos de las NPTiO_2 sobre la fisiología normal de los riñones, órganos principales del sistema urinario, así como su probable participación en los procesos proinflamatorios que inducen en dichos órganos.

4. HIPOTESIS

La magnitud de los efectos tóxicos, hemodinámicos y proinflamatorios renales inducidos por la intoxicación con NPTiO_2 es diferente entre la intoxicación aguda e intermitente.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Evaluar los efectos hemodinámicos y proinflamatorios renales, inducidos por la intoxicación aguda e intermitente de ratas Wistar machos con NPTiO_2 .

5.2 ESPECÍFICOS

Ante las intoxicaciones agudas e intermitentes con NPTiO_2 :

- a) Valorar los cambios en la tasa de filtración glomerular, a través de la prueba de depuración renal de inulina (C-In).
- b) Valorar los cambios en el flujo plasmático renal, a través de la prueba de depuración de para-aminohipurato (C-PAH).
- c) Analizar el manejo renal de agua, sodio, glucosa y creatinina.
- d) Medir la actividad de la enzima TGG en orina.
- e) Cuantificar las concentraciones de MDA en riñón como indicador de estrés oxidativo.
- f) Cuantificar las concentraciones de GSH en riñón y plasma sanguíneo como indicador de la capacidad antioxidante.
- g) Analizar los cambios estructurales de los riñones.
- h) Cuantificar la concentración de $\text{TNF-}\alpha$ en plasma.

6. METODOLOGIA

Tipo de investigación: Básica (estudio exploratorio).

Los estudios experimentales se llevaron a cabo en el laboratorio de Toxicología y Farmacología del edificio 202 del Centro de Ciencias Básicas dentro de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

6.1. GRUPOS EXPERIMENTALES

Los estudios se realizaron en ratas Wistar machos divididas en los siguientes grupos experimentales:

Tabla 1 Grupos experimentales

Grupo	Tratamiento agudo
Control Agudo (n=15)	Íntegros, 3/tiempo de experimentación: 24h, 7 días, 14 días y 28 días.
Intoxicación aguda con NPTiO ₂ Dosis única (n=20)	5 mg/Kg, vía intravenosa (vena caudal) 24 h (n=5) 7 días (n=5) 14 días (n=5) 28 días (n=5)
Control Intermitente (n=15)	Íntegros
Intoxicación intermitente con NPTiO ₂ Dosis repetidas durante cuatro semanas (n=20)	4 dosis en un mes, una por semana 5 mg/Kg. Vía intravenosa (vena caudal)

6.2. ESTUDIOS

Posterior a la intoxicación de los grupos de ratas wistar macho la investigación está dividida en tres estudios:

6.2.1. ESTUDIOS FUNCIONALES

- a) Cirugía experimental para valorar el funcionamiento renal (Figura 12).
- b) Hemodinámica renal (Flujo plasmático renal, tasa de filtración glomerular y fracción de filtración).
- c) Manejo renal de Na^+ , H_2O , y osmolaridad de la orina.
- d) Efecto sobre el mecanismo de reabsorción de glucosa por las células epiteliales del túbulo proximal (glucosuria).
- e) Concentración de malondialdehído (MDA) y glutatión reducido (GSH) en homogenado de corteza renal.



Figura 12 Procedimiento de cirugía experimental.

6.2.1.1. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Previo al tiempo de obtención de muestras en la cirugía se etiquetaron los tubos eppendorf donde se recolectaron las muestras, el etiquetado se identificó con la letra “P” para muestra de plasma y “O” para muestra de orina, colocando el número del animal que fue sometido a la cirugía y un número para identificar la muestra, una vez realizado el etiquetado se realizó el pesaje de los tubos eppendorf destinados a la obtención de orina, se procedió a heparinizar las jeringas con capacidad de 1 mL para la obtención de sangre.

Durante el tiempo de obtención de muestras se colocó el tubo eppendorf en el extremo de la sonda tipo Foley, recolectando orina durante 30 minutos; la obtención de sangre se realizó a los 15 minutos del tiempo de obtención de muestra, se realizó mediante punción de la arteria caudal.

Finalizado el tiempo de obtención de muestra se realizó el pesaje de los tubos eppendorf con la muestra de orina y las muestras de sangre se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm para la obtención de plasma, una vez obtenido el plasma se colocaron en los tubos eppendorf previamente etiquetados, almacenándose en refrigeración para su posterior análisis.

6.2.1.2. TÉCNICAS UTILIZADAS

Se realizó la evaluación de los parámetros incluidos en la tabla 2 técnicas a utilizar, los parámetros de inulina, PAH, glucosa, creatinina y sodio se evaluaron en muestras de orina y plasma.

Tabla 2 Técnicas a utilizar

PARÁMETRO	JUSTIFICACIÓN	REFERENCIA
1) Concentraciones plasmáticas y urinarias de inulina (C-In)	Prueba útil para valorar la velocidad de filtración glomerular	Füer <i>et al</i> , 1955 He <i>et al</i> , 2006
2) Concentraciones plasmáticas y urinarias de PAH (C-PAH)	Prueba útil para valorar el flujo plasmático renal	Arendhorst <i>et al</i> , 1975 He <i>et al</i> , 2006
3) Volumen urinario	Marcador de la función renal	Método volumétrico
4) Concentraciones plasmáticas y urinarias de sodio (C-Na ⁺ y EFNa ⁺)	Valoración del manejo renal de electrolitos (Na ⁺)	Método flamométrico
5) Concentraciones plasmáticas y urinarias de glucosa (C-Glucosa)	Marcador de la función de células tubulares proximales	Trinder, 1969
6) Concentraciones plasmáticas y urinarias de creatinina (C-Creatinina)	Marcador de daño glomerular	Bartels y Böhmer, 1971 Fabiny y Ertingshausen, 1971
7) Actividad de la TGG en corteza renal	Marcador de daño de células tubulares proximales	Orlowski y Meister, 1963
8) Concentración de MDA en homogenado de riñón	Marcador de lipoperoxidación	Esterbauer y Cheeseman, 1990
9) Concentración de GSH en homogenado de riñón y en plasma	Marcador de protección antioxidante	Cohn y Lyle, 1966.

Cada medición se realizará por duplicado.

6.2.2. ESTUDIO ESTRUCTURAL

Se extrajo uno de los riñones de cada animal experimental y se conservó en formalina neutra al 10% hasta su procesamiento. Mediante la técnica histológica se obtuvieron cortes de riñón de 5 μm de grosor, en microtomo. Posteriormente se realizaron las tinciones convencionales con hematoxilina y eosina y se procedió a la valoración del daño celular mediante microscopio óptico.

6.2.3. ESTUDIO MOLECULAR

Se valoró la expresión del factor de necrosis tumoral alta (TNF- α) en plasma sanguíneo, mediante la técnica de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) kit Sigma-Aldrich Rat Tumor Necrosis Factor- α para suero, plasma y cultivo celular sobrenadante.

6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

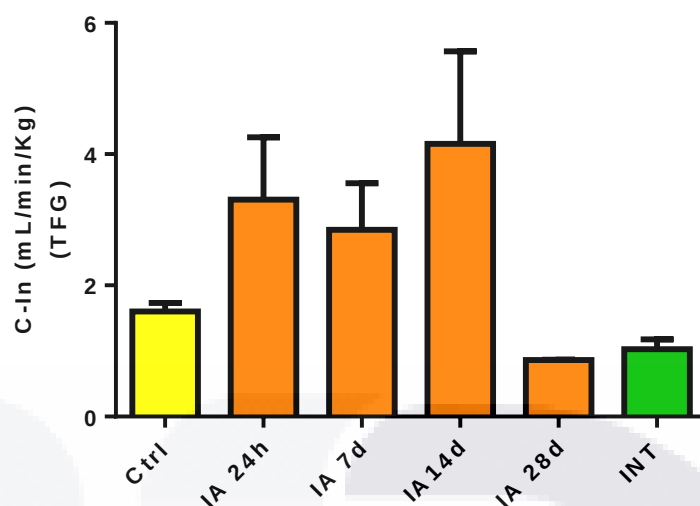
Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante las pruebas de ANOVA y Tukey - Kramer.

7. RESULTADOS

Se muestran los resultados obtenidos en ratas controles intactos y sometidos a cirugía experimental para la obtención de muestras.

7.1. ANÁLISIS DE ACLARAMIENTO DE INULINA

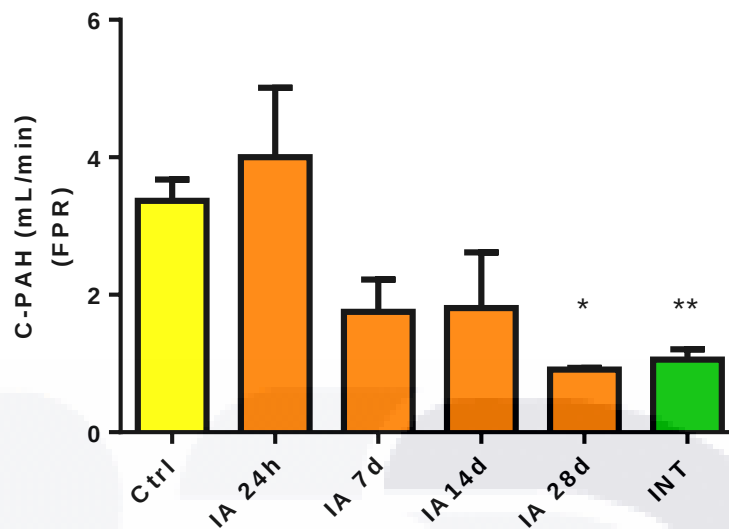
Se realizó la evaluación del aclaramiento de inulina en grupos de intoxicación aguda e intermitente, observándose un aumento en el aclaramiento de inulina en los grupos de intoxicación aguda evaluado a las 24 horas, 7 días y 14 días y una disminución por debajo del grupo control en los grupos de intoxicación aguda a los 28 días y en el de intoxicación intermitente, sin embargo no se encontró una diferencia significativa entre el grupo control y los grupos de intoxicación aguda e intermitente (gráfica 1).



Gráfica 1 Evaluación del C-In (mL/min) en grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. No presenta diferencia estadísticamente significativa entre los grupos evaluados.

7.2. ANÁLISIS DE ACLARAMIENTO DE PARA-AMINOHIPURATO.

Se realizó la evaluación del aclaramiento de para-aminohipurato en grupos de intoxicación aguda e intermitente y se comparó con el grupo control, se observó un aumento en el aclaramiento de para-aminohipurato en el grupo agudo evaluado a las 24 horas y una posterior disminución en los grupos agudos evaluados a los 7, 14 y 28 días, así como en el grupo de intoxicación intermitente; se encontró una diferencia estadísticamente significativa de $P < 0.05$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación aguda evaluado a los 28 días, también se observa diferencia estadísticamente significativa $P < 0.01$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación intermitente (Gráfica 2).

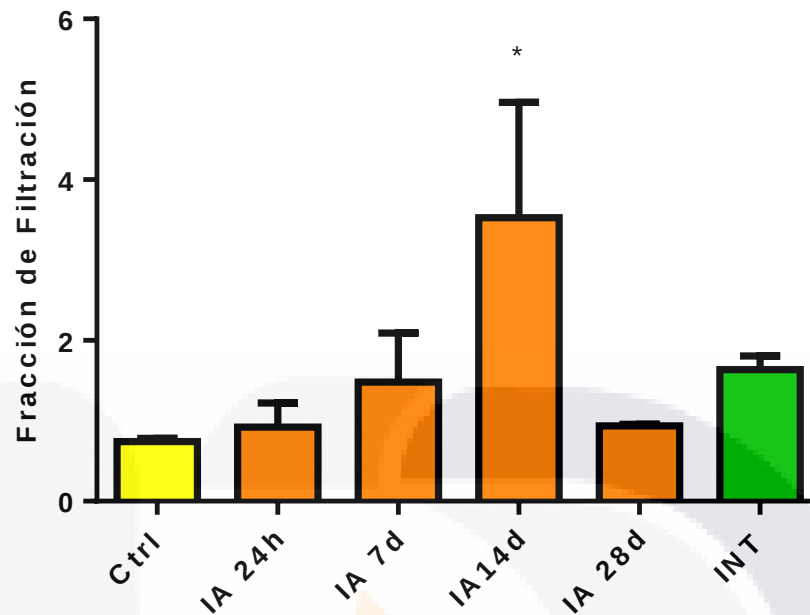


Gráfica 2. Evaluación del C-PAH (mL/min) en grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. Presenta diferencias estadísticamente significativas:

*** $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.**

7.3. FRACCIÓN DE FILTRACIÓN

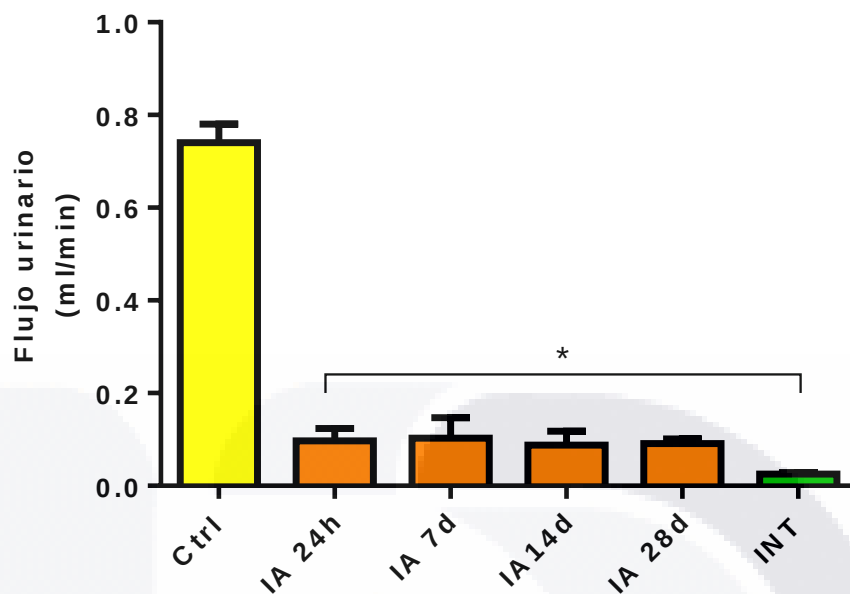
Una vez obtenidos los aclaramientos de In y PAH se realizó la obtención de la fracción de filtración, observándose un aumento en comparación con el grupo control, siendo mayor en el grupo agudo evaluado a los 14 días, también se observa una tendencia a la normalización al día 28; obteniendo una diferencia estadísticamente significativa de $P < 0.01$ entre el grupo control y el grupo agudo evaluado a los 14 días (Gráfica 3).



Gráfica 3. Evaluación de la fracción de filtración en los grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. Presenta diferencia estadísticamente significativa: * $P < 0.01$.

7.4. MANEJO RENAL DE AGUA

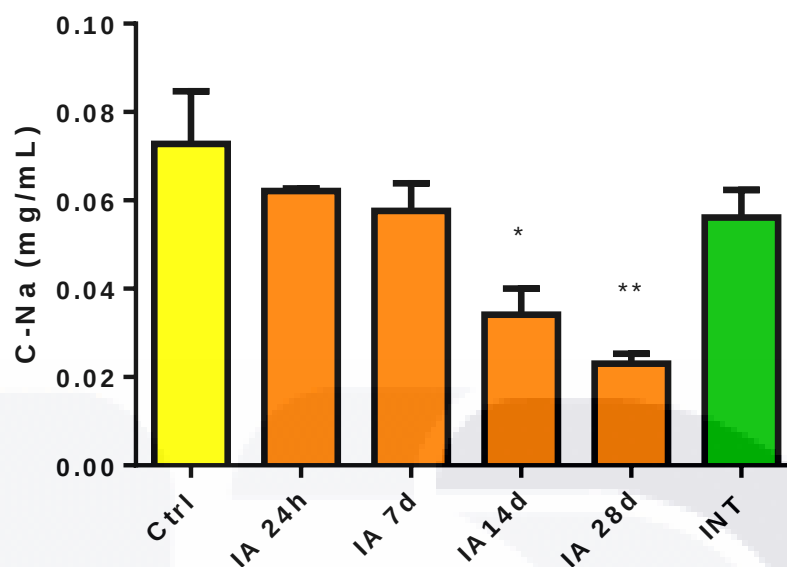
Se evaluó el manejo renal de agua en los grupos de ratas intoxicados con TiO_2 en los cuales se pudo observar una oliguria en ambos grupos de intoxicación comparados con el grupo control, existiendo una diferencia estadísticamente significativa de $P < 0.05$ entre todos los grupos intoxicados con respecto al control (gráfica 4).



Gráfica 4. Evaluación del flujo urinario (mL/min) como manejo renal de agua en los grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. Presenta diferencia estadísticamente significativa: * $P < 0.0001$

7.5.DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE SODIO

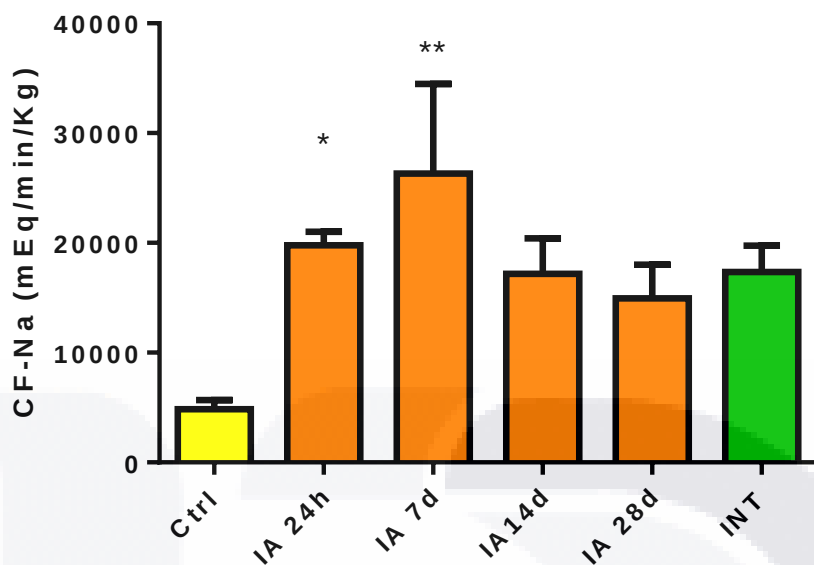
Se realizó la evaluación del aclaramiento de Na en grupos de intoxicación aguda e intermitente, en el cual se observa una disminución constante en el grupo agudo, sin embargo en el grupo de intoxicación intermitente no se ve una disminución en el aclaramiento tan marcado. Se observa una diferencia significativa de $P < 0.01$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación aguda evaluado a los 14 días, una diferencia de $P < 0.001$ entre el control y el grupo agudo evaluado a 28 días (Gráfica 5).



Gráfica 5 Evaluación de C-Na (mg/min) en los grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. Presenta diferencias estadísticamente significativas:

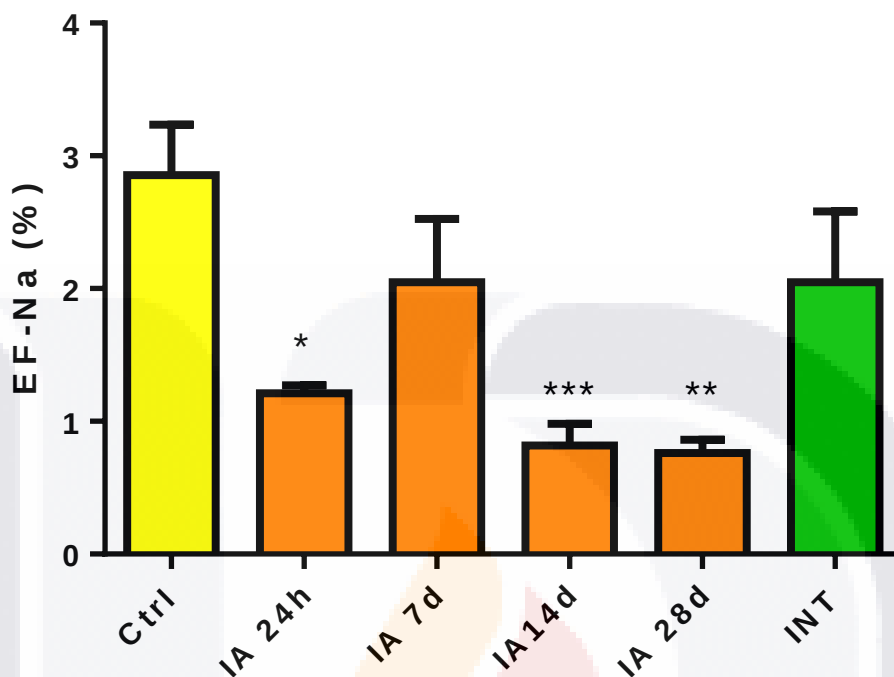
*** $P < 0.01$ y ** $P < 0.001$.**

En la gráfica 6 se observa la carga filtrada de sodio CF-Na obtenida en los grupos de intoxicación aguda e intermitente en comparación con el grupo control. Se puede observar un aumento de la CF-Na en ambos grupos evaluados, presenta una diferencia significativa de $P < 0.05$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación aguda evaluado a las 24 horas, así como una diferencia significativa de $P < 0.001$ entre el grupo control y el grupo agudo evaluado a los 7 días.



Gráfica 6 Evaluación de la CF-Na (mEq/min/Kg) en los grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. Presenta diferencias estadísticamente significativas: * $P < 0.05$ y ** $P < 0.001$.

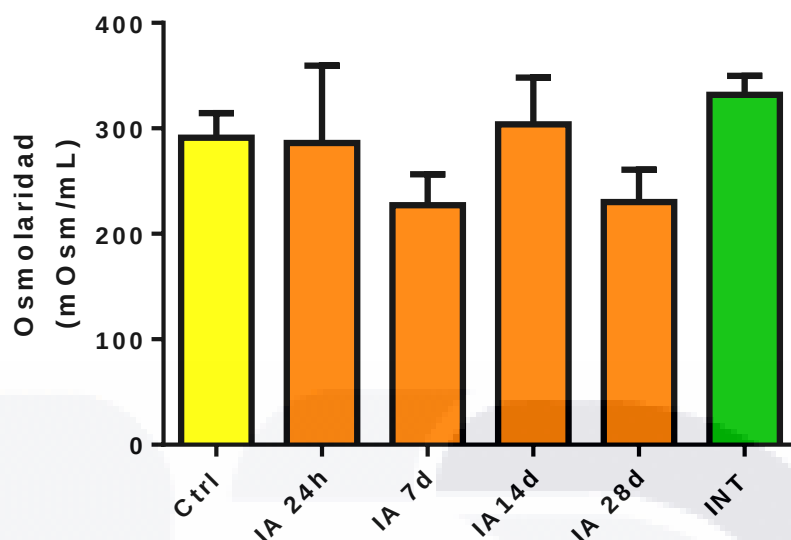
En la gráfica 7 se presenta el análisis de la excreción fraccionada de sodio (EF-Na) obtenida en los grupos de intoxicación aguda e intermitente en comparación con el grupo control. En la cual se observó en el grupo agudo evaluado a las 24 horas una disminución por debajo de la media del grupo control, sin embargo se apreció un aumento en la evaluación del día 7 así como una posterior disminución aún por debajo de la obtenida en la evaluación de las 24 horas, en el grupo de intoxicación intermitente se observó una disminución de la EF-Na aunque no presenta significancia. Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa de $P < 0.05$ entre el grupo control y el grupo agudo evaluado a las 24 horas, una diferencia significativa de $P < 0.01$ en el grupo agudo evaluado a los 28 días y una diferencia significativa de $P < 0.001$ en el grupo de intoxicación aguda evaluado a los 14 días.



Gráfica 7 Evaluación de EF-Na (%) en los grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. Presenta diferencias significativas: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

7.6.DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE OSMOLARIDAD URINARIA

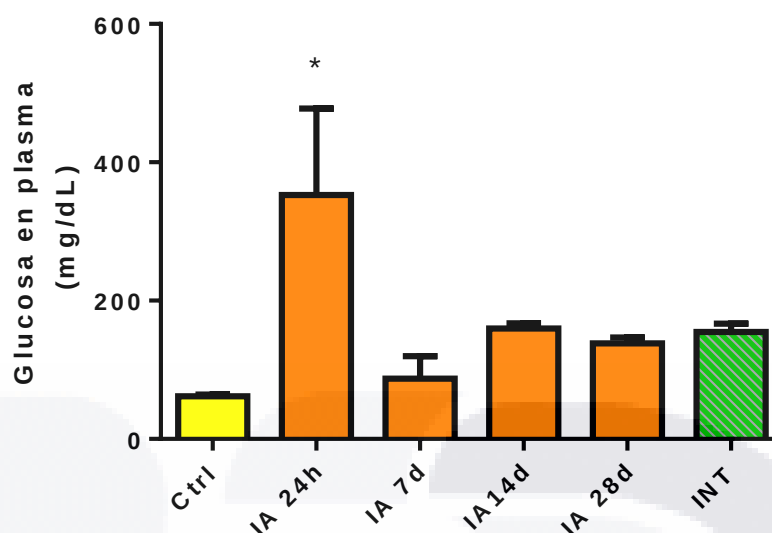
Se realizó la evaluación de la osmolaridad urinaria en las muestras de intoxicación aguda e intermitente comparado con el grupo control, en las cuales se observa una disminución de la osmolaridad en los grupos de intoxicación aguda evaluados a 24 horas, 7 y 28 días con respecto al grupo control, así como un aumento en los grupo agudo evaluado a los 14 días y en el grupo de intoxicación intermitente, no se obtuvo diferencia significativa entre los grupos (gráfica 8):



Gráfica 8 Evaluación de la osmolaridad urinaria (mOsm/mL) de los grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. No presenta diferencias estadísticamente significativas.

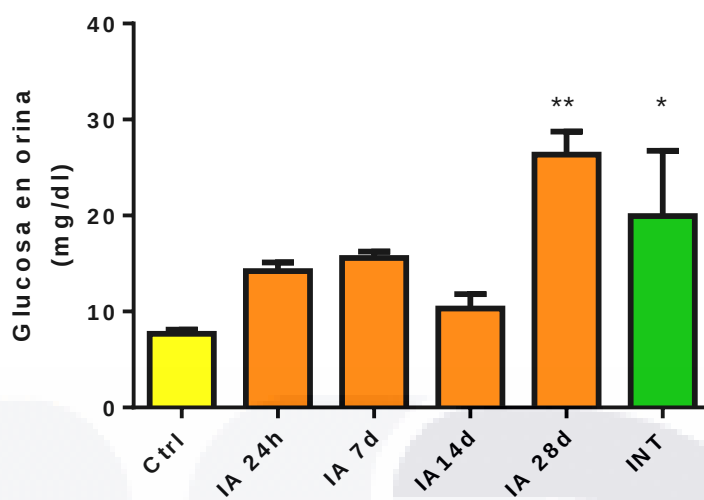
7.7.DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GLUCOSA.

La gráfica 9 muestra la concentración plasmática de glucosa en los grupos de intoxicación aguda e intermitente comparado con los valores control, en la cual se observa una hiperglicemia en todos los grupos de intoxicación, siendo los mayores valores en el grupo de intoxicación aguda evaluado a 24 horas. Se observa una diferencia significativa de $p < 0.01$ entre el grupo control y el grupo evaluado a las 24 horas.



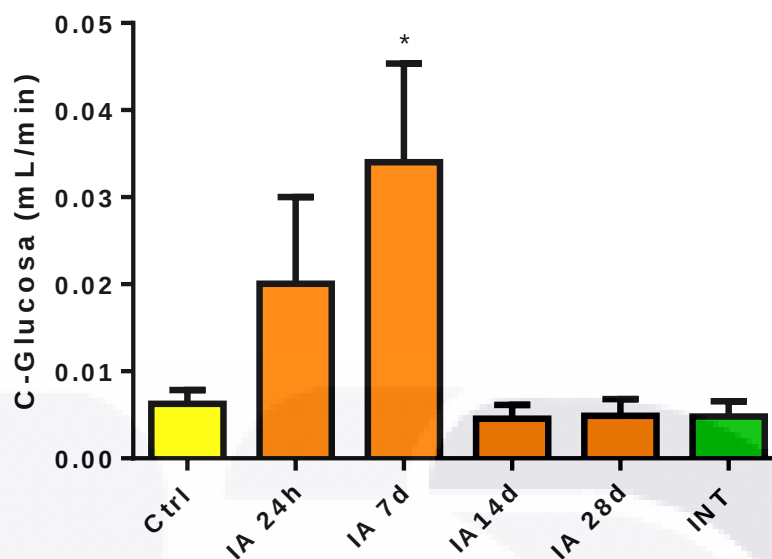
Gráfica 9 Evaluación de la concentración de glucosa (mg/dL) en plasma en los grupos agudos e intermitente comparados con el grupo control. Presenta diferencia estadísticamente significativa: * P<0.01.

La gráfica 10 muestra la concentración de glucosa en orina presente en los grupos de intoxicación aguda e intermitente comparado con los valores control, en la cual se observa una glucosuria en todos los grupos de intoxicación, siendo los mayores valores en el grupo de intoxicación aguda evaluado a 28 días. Se observa una diferencia significativa de $P<0.01$ entre el grupo control y el grupo agudo evaluado a los 28 días de la intoxicación aguda; así como también se observa diferencia significativa de $P<0.05$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación intermitente.



Gráfica 10 Evaluación de la concentración de glucosa (mg/dL) en orina en los grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. Presenta diferencias significativas: * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$.

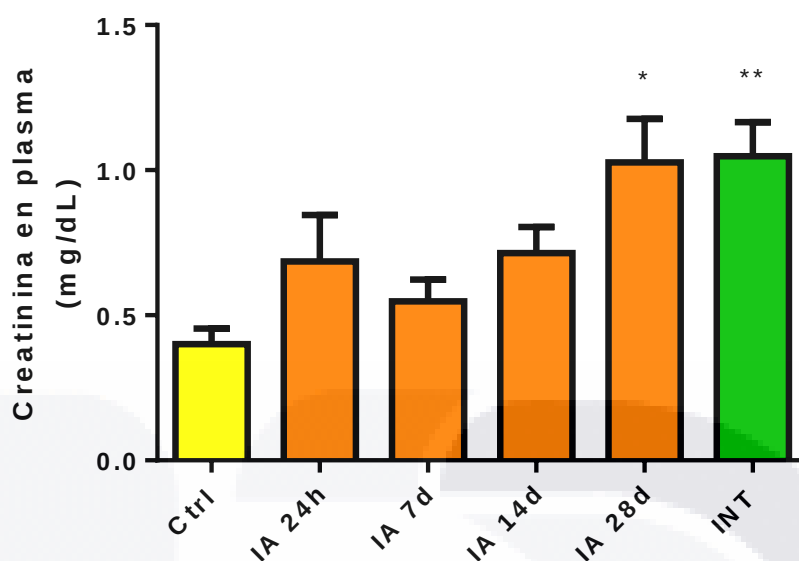
En la gráfica 11 se muestra el aclaramiento de glucosa obtenida en los grupos de intoxicación aguda e intermitente en comparación con el grupo control, en el cual se puede observar un aumento en el grupo agudo evaluado a las 24 horas y 7 días, así como una disminución aún por debajo del nivel del grupo control. Se observa una diferencia estadísticamente significativa de $P < 0.01$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación aguda evaluado a los 7 días.



Gráfica 11 Evaluación del C-glucosa (mL/min) en grupos de intoxicación aguda e intermitente en comparación con el grupo control. Presenta diferencia significativa: * $P < 0.01$.

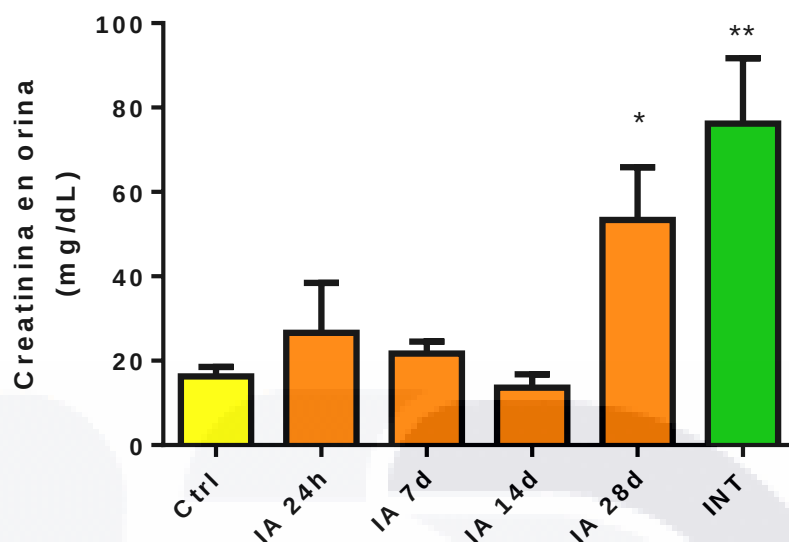
7.8.DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE CREATININA

Se realizó la determinación de creatinina en muestras de orina y plasma. Los resultados se muestran en las gráficas 12 y 13. En la gráfica 12 se muestra la concentración de creatinina en plasma de los grupos de intoxicación aguda e intermitente, comparándose con los valores del grupo control, observándose un aumento en la concentración de creatinina con respecto al grupo control, se encontró diferencia significativa de $P < 0.01$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación aguda evaluado a los 28 días, así como una diferencia de $P < 0.001$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación intermitente.



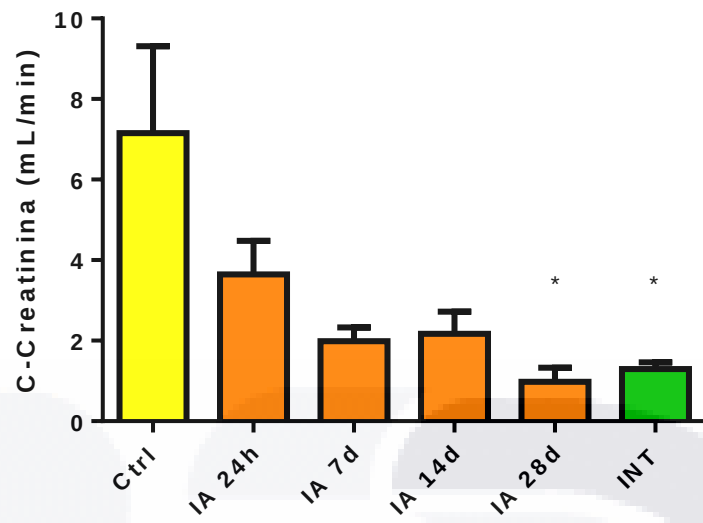
Gráfica 12 Evaluación de la concentración de creatinina (mg/dL) en plasma en grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. Presenta diferencias estadísticamente significativas: * $P < 0.01$ y ** $P < 0.001$.

En la gráfica 13 se observa la concentración de creatinina presente en orina en los grupos de intoxicación aguda e intermitente, comparándose con los valores del grupo control, en el cual se observa una disminución de la concentración de creatinina en los grupos de intoxicación aguda evaluados a los 7 y 14 días, sin embargo se ve un drástico aumento en el grupo de intoxicación aguda evaluado a los 28 días, al igual se observa un aumento de creatinina en el grupo de intoxicación intermitente. Se encontró diferencia significativa de $P < 0.01$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación intermitente, así como también se ve una diferencia de $P < 0.05$ entre el grupo de intoxicación aguda evaluado a los 28 días y el grupo control.



Gráfica 13 Evaluación de la concentración de creatinina (mg/dL) en orina en grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. Presenta diferencias estadísticamente significativas: * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$.

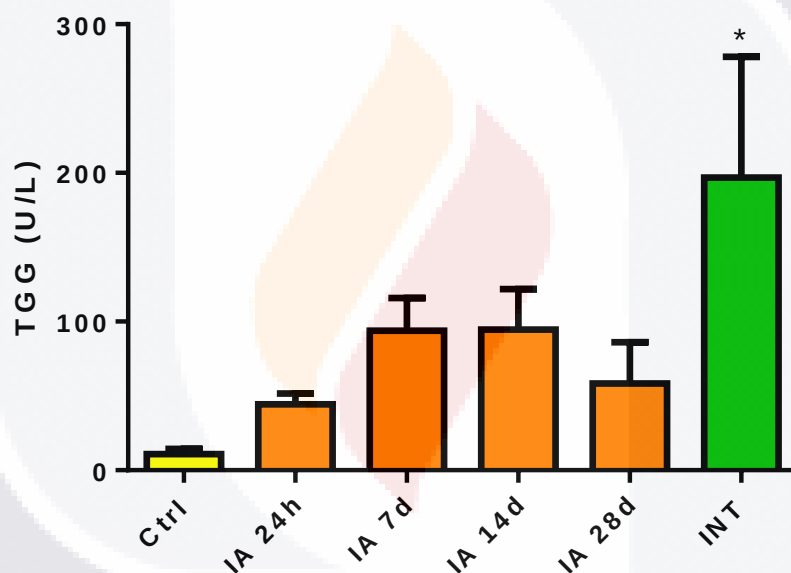
En la gráfica 14 se muestra el análisis de aclaramiento de creatinina obtenido, como se puede observar se presenta una marcada disminución del aclaramiento de la creatinina, existe una diferencia estadísticamente significativa de $P < 0.01$ entre el grupo control y el grupo agudo evaluado a los 28 días y el grupo de intoxicación intermitente.



Gráfica 14 Evaluación del C-creatinina (mL/min) en grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. Presenta diferencia estadísticamente significativa: * P<0.01.

7.9.DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TGG EN ORINA

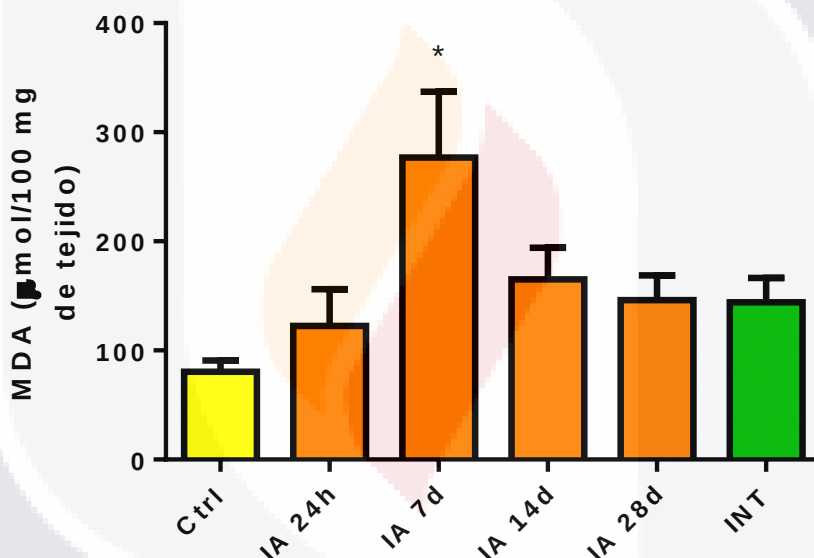
Se realizó la evaluación de la actividad de la enzima TGG en muestras de orina de grupos de intoxicación aguda e intermitente, así como en el grupo control, se puede observar un aumento en la actividad enzimática de esta enzima en el grupo agudo e intermitente. Se observa diferencia estadísticamente significativa de $P < 0.05$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación intermitente (gráfica 15).



Gráfica 15 Evaluación de la actividad enzimática de TGG (U/L) en muestras de intoxicación aguda e intermitente, comparados con el grupo control. Presenta diferencia estadísticamente significativa: * $P < 0.05$.

7.10. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE MALONDIALDEHÍDO EN TEJIDO

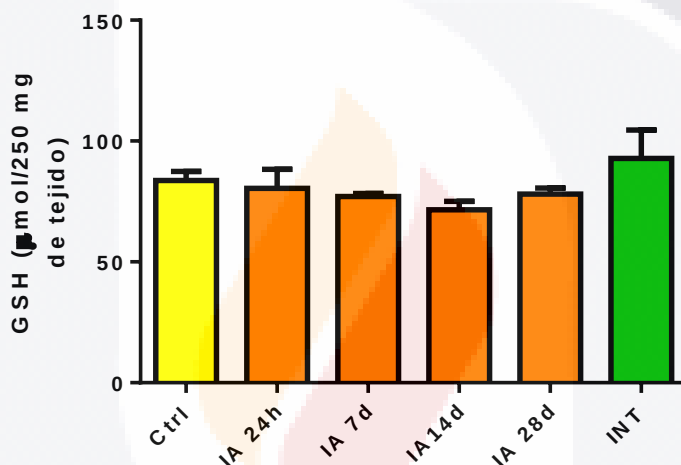
Se realizó la evaluación de MDA en riñones, obtenidos en las cirugías a diferentes tiempos, los resultados se presentan en la gráfica 16, se muestra un aumento en la concentración de MDA en todos los grupos de estudio, siendo más significativo en el grupo agudo evaluado a los 7 días; se puede observar que existe una diferencia estadísticamente significativa de $P \leq 0.001$ entre el grupo control y el grupo analizado a los 7 días.



Gráfica 16 Evaluación de concentración de MDA ($\mu\text{mol} \cdot 100 \text{ mg}$ de tejido) en riñones de grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. Presenta diferencia estadísticamente significativa: * $P < 0.001$.

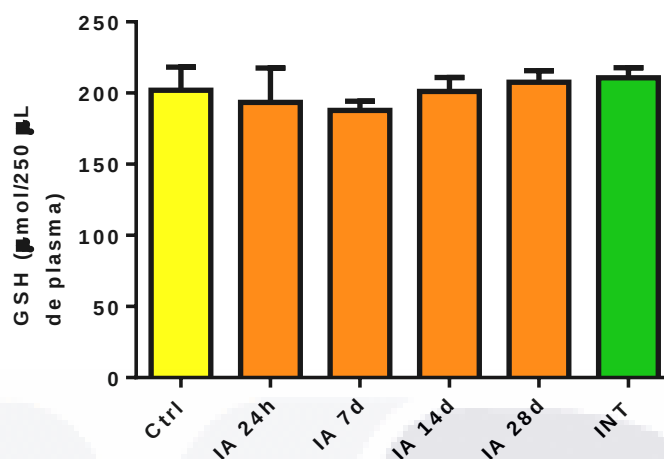
7.11. DETERMINACION CUANTITATIVA DE GSH

Se realizó la evaluación de GSH en riñones, obtenidos en las cirugías a diferentes tiempos e intoxicaciones y los resultados se presentan en la gráfica 17, se observa una disminución en la concentración de GSH en el grupo de intoxicación aguda en los tiempos evaluados, sin embargo en el grupo de intoxicación intermitente se ve un aumento por arriba de la concentración del grupo control, no se observan diferencias significativas entre grupos.



Gráfica 17 Evaluación de la concentración de GSH ($\mu\text{mol} \cdot 250 \text{ mg}$ de tejido) en riñón de grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. No presentan diferencias estadísticamente significativas.

En la gráfica 18 se observan los resultados de GSH obtenidos en muestras de plasma de los grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. Se puede observar una ligera disminución en la concentración de GSH en el grupo agudo evaluado a las 24 horas y los 7 días, así como un aumento a nivel del grupo control en el grupo agudo evaluado a los 14 y 28 días, también se observa en el grupo de intoxicación intermitente. No se observan diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 18 Evaluación de la concentración de GSH ($\mu\text{mol} \cdot 250 \mu\text{L}$) en plasma en grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. No presentan diferencias estadísticamente significativas.

7.12. ANALISIS ESTRUCTURAL RENAL

Una vez realizados los cortes histológicos ($5\mu\text{m}$) y la tinción HE, se tomaron las fotografías al tejido más representativo de las laminillas, es decir aquel que no presentaba pliegues o rupturas causadas por la manipulación; se puede observar el tejido integral perteneciente al grupo control (a), edema celular, necrosis y desprendimiento celular hacia la luz tubular en el grupo agudo evaluado a las 24 horas (b), se observan tubos desnudos y pérdida celular en el grupo agudo evaluado a los 7 días (c), en el grupo agudo evaluado a los 14 días se puede observar necrosis celular con desprendimiento hacia la luz tubular así como tubos desnudos (d), en la laminilla del grupo agudo evaluado a los 28 días se observa reparación tubular, no presenta detritus en la luz tubular (e), se puede observar en el grupo de intoxicación intermitente regeneración tubular, necrosis tubular con desprendimiento hacia la luz tubular así como edema celular (f); los resultados se pueden observar en la figura 13.

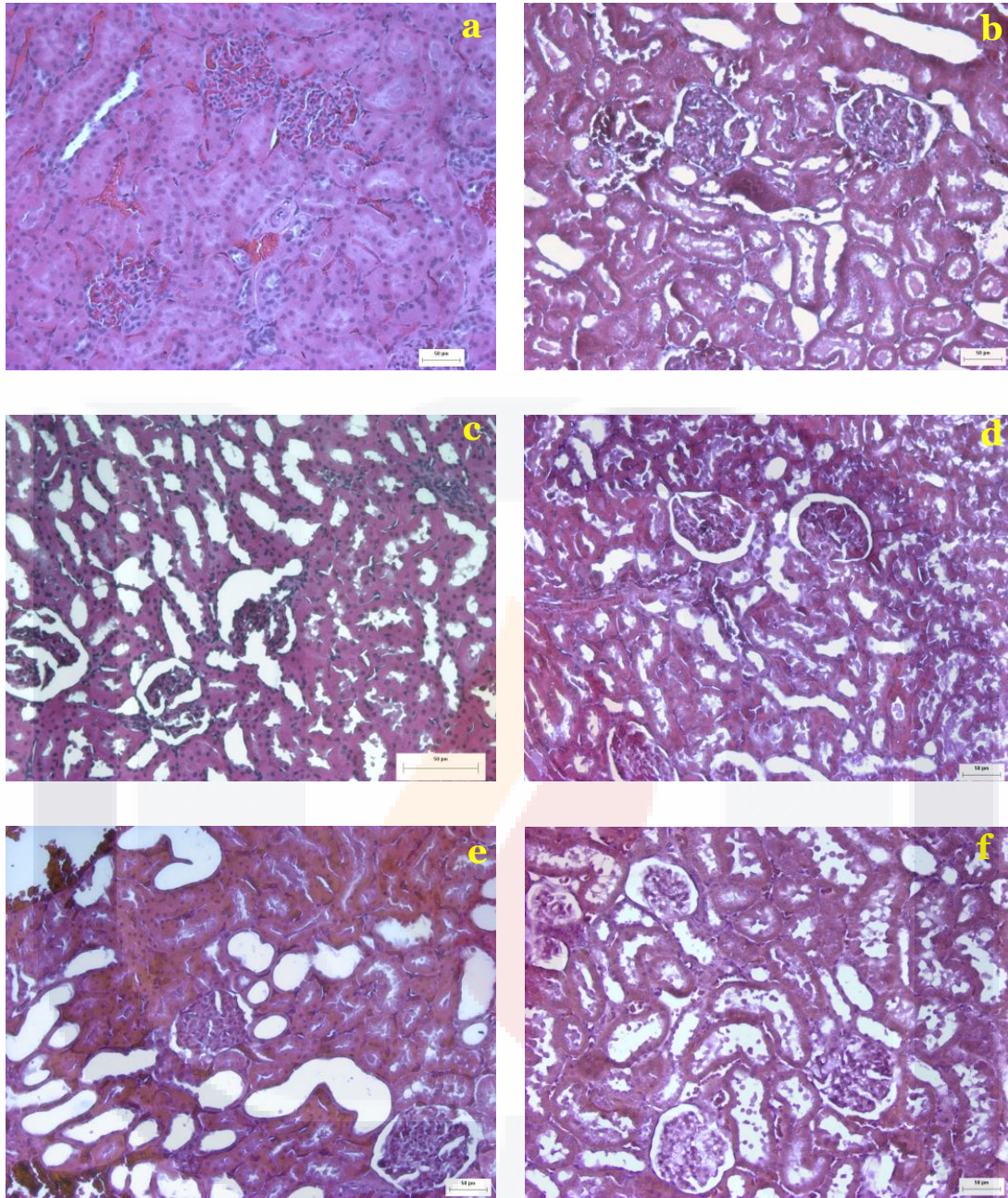


Figura 13 Cortes histológicos de riñón (5µm), teñidos con HE y observados a 10x; a) Control; b) Int. Aguda 24 horas; c) Int. Aguda 7 días; d) Int. Aguda 14 días; e) Int. Aguda 28 días f) Int. Intermitente.

7.13. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TNF- α EN PLASMA

Se realizó el análisis cuantitativo de TNF- α , sin embargo no se obtuvieron los resultados esperados, se puede observar en las columnas 1 y 2 la curva de estandarización (duplicado), se observa la celda 6E color, sin embargo las muestras se colocaron por triplicado y al no observar un indicio de color en las celdas 6D y 6F se consideró contaminación (figura 14).



Figura 14 Análisis de TNF- α , mediante método de ELISA.

8. DISCUSION

Como ya se había explicado con anterioridad los riñones son los órganos excretores, los encargados de regular el equilibrio hidroeléctrico, de regular el equilibrio acido-base y también ayudan a regular la presión arterial (Ramón, 2006; Gómez, 2014).

Hemodinámica renal:

Tasa de filtración glomerular C-In. El estudio del grupo agudo evaluados a las 24 horas, 7 días y 14 días presentó un aumento en el aclaramiento de la inulina, sin embargo presentó una disminución debajo de los niveles del grupo control en las ratas de intoxicación aguda evaluadas a los 28 días, así como el grupo de intoxicación intermitente. La tasa de filtración glomerular se vio alterada en los grupos de intoxicación aguda e intermitente, sin embargo estos cambios no fueron significativos. La inulina en el riñón se filtra libremente por el glomérulo, no es biotransformada, no es reabsorbida y no es secretada, por lo cual en la orina aparece todo lo que fue filtrado, de acuerdo a lo anterior se necesita contar con el volumen urinario obtenido en cierta cantidad de tiempo, así como la concentración de inulina en plasma y orina (Puyol et al, 2010). La filtración y la reabsorción están unidas intrínsecamente, la fuerza hidrostática proporciona energía para la reabsorción concentrando los coloides; la presión de filtración opuesta se disipa por la resistencia de los capilares, y la presión oncótica coloidal se vuelve cada vez más efectiva, favoreciendo la reabsorción. Un sistema de detección a la óptima reabsorción es el aparato yuxtaglomerular, el cual une un segmento tardío al final de la extremidad gruesa ascendente del asa de Henle, donde la nefrona vuelve a al glomérulo, las células de la pared tubular se diferencian en células de la mácula densa, es aquí donde se encuentran células secretoras de renina. Como respuesta a un fallo de reabsorción la tasa de filtración se reduce por la vasoconstricción de las arteriolas glomerulares, reduciendo el flujo sanguíneo renal. La formación intrarrenal de angiotensina II y su liberación en el intersticio renal en lugar de en la sangre, este mecanismo de retroalimentación tubuloglomerular mediante el cual la tasa de filtración glomerular de la nefrona se

regula de acuerdo con la eficiencia de la reabsorción (Thureau *et al*, 1976; Franco *et al*, 1992).

Flujo plasmático renal C-PAH. El análisis de los resultados muestran un aumento del aclaramiento de PAH en el grupo agudo evaluado a las 24 horas, así como una posterior disminución de este en los grupos agudos evaluados a los 7, 14 y 28 días, y también en el grupo de intoxicación intermitente; existiendo una significancia en el grupo agudo evaluado a los 28 días y en el grupo intermitente. El PAH en el riñón se filtra por el glomérulo, no es biotransformado, no es reabsorbida, sin embargo si es secretado, por lo cual en la orina aparece todo lo que fue filtrado más lo que fue secretado desde los capilares peritubulares a nivel de túbulo proximal; de acuerdo a lo anterior se necesita contar con el volumen urinario obtenido en cierta cantidad de tiempo, así como la concentración de inulina en plasma y orina (Puyol *et al*, 2010). Los túbulos proximales secretan varios aniones orgánicos, incluidos fármacos y el PAH. La captación de PAH desde los capilares peritubulares hacia las células tubulares debido al intercambio de α -cetoglutarato intracelular y utilizando el transportador de aniones orgánico 1 (OAT1), el PAH pasa a la luz tubular mediante impulso de gradiente eléctrico y por el MRP2 (Proteína de resistencia múltiple a fármacos) (Burckhardt *et al*, 2001). El aumento encontrado en la evaluación de las 24 horas del grupo agudo se puede relacionar con la capacidad que presentan los riñones para mantener el FPR mediante una autorregulación, activando el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Arendhorst, 1975). Como se puede observar tanto la FG y el FPR se ven disminuidos a los 28 días de la intoxicación aguda y en el grupo de intoxicación intermitente, por lo que se infiere no es suficiente la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Evaluación de FF. Como ya se ha indicado la FF es una relación entre las depuraciones de In y PAH, la cual indica la fracción de plasma que es filtrada por el glomérulo; se pudo observar un aumento de esta, tanto en el grupo de intoxicación aguda como en el intermitente, sin embargo se observa el aumento

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

más significativo a los 14 días de la evaluación del grupo agudo, aunque se observa una tendencia a la normalización a los 28 días de evaluación continua por arriba de los niveles del grupo control. Como ya se ha planteado la FF fluctúa en función a la vasodilatación y vasoconstricción de las arteriolas aferentes y eferentes, por lo que este aumento significativo indica que el sistema compensatorio se activó para tratar de autorregular el FPR y el FG.

Manejo renal de agua y sodio

Se evaluó el manejo renal de agua en los grupos de ratas intoxicados con TiO_2 , se observó oliguria en ambos grupos de intoxicación comparados con el grupo control. El túbulo distal es prácticamente impermeable al agua, la permeabilidad al agua en el túbulo colector baja en ausencia de ADH y es alta en presencia de esta. En presencia de ADH, el fluido tubular es isotónico en el intersticio tubular, lo que significa que en la médula y en la papila se reabsorbe gran cantidad de agua, por lo que la eliminación de agua mediante la orina, es baja (Jamison & Hall, 1983). Esto significaría que el TiO_2 causaría además del sistema renina-angiotensina–aldosterona la activación de la hormona antidiurética.

Aclaramiento de Na se observa una disminución constante en el grupo agudo, sin embargo en el grupo de intoxicación intermitente no se ve una disminución en el aclaramiento tan marcado. Existiendo una diferencia significativa de $P < 0.01$ en el grupo de intoxicación aguda evaluado a los 14 días y una diferencia de $P < 0.001$ en el grupo agudo evaluado a 28 días. *CF-Na* obtenida en los grupos de intoxicación aguda e intermitente. Se puede observar un aumento en los grupos evaluados, presentando diferencia significativa de $P < 0.05$ en el grupo agudo evaluado a las 24 horas y una diferencia significativa de $P < 0.001$ en el grupo agudo evaluado a los 7 días, esto comparados con el grupo control. *La EF-Na* obtenida en los grupos de intoxicación aguda e intermitente fue menor en comparación con el grupo control, en el grupo agudo evaluado a las 24 horas se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

presenta por debajo de la media obtenida en el grupo control, a los 7 días la EF-Na se incrementa aunque sin alcanzar al grupo control, para posteriormente encontrarse por debajo de la EF-Na obtenida a las 24 horas, esto en los grupos evaluados a los 14 y 28 días. El grupo de intoxicación intermitente presentó una disminución a nivel de la encontrada a los 7 días del grupo agudo. Observándose diferencias significativas en el grupo agudo evaluado a las 24 horas, 14 y 28 días.

El Na se excreta y secreta en distintos partes de los túbulos de la nefrona, siendo en estas partes donde se da el control de las concentraciones plasmáticas de este. Es claro que la hemodinámica renal afecta la excreción renal de sodio; en el túbulo proximal se reabsorbe el 65% del sodio filtrado por el glomérulo y el resto se reabsorbe en el asa de Henle ascendente, túbulo distal, túbulo conector y el túbulo colector, con esto se trata de asegurar que si existe un problema en el túbulo proximal las otras partes eviten un aumento en la excreción de Na por la orina. La excreción fraccional de sodio es un índice de diagnóstico ampliamente utilizado en la insuficiencia renal; se utiliza clínicamente en pacientes con insuficiencia renal para distinguir entre "prerenal" o "intrarrenal/intrínseca" (Venkatesh *et al*, 1998; Eaton *et al*, 2006).

Los cambios obtenidos infieren una lesión en los túbulos proximales. La reducción de la tasa de filtración glomerular para ajustarse a la reabsorción disminuida indica que los glomérulos asumen la función de conservación del volumen ejercida por los túbulos, si la tasa de filtración glomerular se mantuviera normal y la reabsorción tubular se redujera en un 50 por ciento el volumen urinario y la excreción de sodio serían la mitad de la carga filtrada (Thurau *et al*, 1976).

Se evaluó la *osmolaridad urinaria* para conocer el comportamiento de los solutos disueltos en la orina producida tanto en las ratas control como en el grupo intoxicación aguda e intermitente, se observa una disminución de la osmolaridad en los grupos de intoxicación aguda evaluados a 24 horas, 7 y 28 días con respecto al grupo control, así como un aumento en los grupo agudo evaluado a los 14 días y en el grupo de intoxicación intermitente, sin embargo no presenta diferencia significativa entre los grupos. Escárcega y colaboradores en 2016

encontraron un aumento significativo a las 24-48 horas de su estudio de ratas wistar intoxicadas con NPs TiO_2 , sin embargo esto no coincide con lo obtenido en este estudio, esto puede deberse a que la colección de la muestra se realizó durante varias horas.

Analizar el manejo renal de glucosa. *Glucosa en plasma* se puede observar una hiperglicemia en ambos grupos de intoxicación, siendo los mayores valores en el grupo de intoxicación aguda evaluado a 24 horas, presentando una diferencia significativa de $P < 0.01$. El riñón contribuye a la homeostasis de la glucosa mediante la gluconeogénesis, la filtración, reabsorción y consumo de la glucosa, mantener este equilibrio evita las consecuencias patológicas de una hiperglucemia o hipoglucemia prolongada; la hiperglucemia contribuye al aumento de complicaciones vasculares, nefropatía, retinopatía y neuropatía. Por otro lado la hipoglucemia puede provocar daño al sistema nervioso central. Normalmente los riñones filtran hasta 180g/día de glucosa y se reabsorbe posteriormente en el túbulo contorneado proximal, esto mediante dos proteínas cotransportadoras de glucosa dependientes de sodio (SGLT). SGLT2, situado en el segmento S1, es un transportador de alta capacidad y baja afinidad que reabsorbe hasta el 90% de la glucosa filtrada. SGLT1, situado en el segmento S3, es un transportador de baja capacidad y alta afinidad que reabsorbe el 10% restante. Una vez que la glucosa ha sido reabsorbido en las células epiteliales tubulares, se difunde en el intersticio a través de transportadores de glucosa facilitadores específicos (GLUT). GLUT1 y GLUT2 están asociados con SGLT1 y SGLT2, respectivamente (Triplitt, 2012; Mather, *et al*, 2011; Szablewski, 2017; Hall *et al*, 2011). Díaz y colaboradores (2013) utilizaron a las NPstTiO_2 dopadas con extracto de *Stevia rebaudiana bertonii* a una concentración de 1g/Kg, sin embargo utilizaron las NPs sin dopar, y encontraron que estas no causaban hiperglucemia a las 24 horas, lo que puede inferir que la concentración de NPs podría potenciar la gluconeogenesis.

Glucosa en orina se observa una glucosuria en todos los grupos de intoxicación, siendo los mayores valores en el grupo de intoxicación aguda evaluado a 28 días y presentando una diferencia significativa de $P < 0.01$; también

se observa diferencia significativa de $P<0.05$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación intermitente. Esta glucosuria se podría explicar por la pérdida o daño en los túbulos proximales y por ende la pérdida de los transportadores de glucosa SGLT1 SGLT2.

Aclaramiento de glucosa, se puede observar un aumento en el grupo agudo evaluado a las 24 horas y 7 días, así como una disminución bajo el nivel del grupo control en el grupo agudo evaluado a los 14, 28 días y en el grupo de intoxicación intermitente. Presentando una diferencia estadísticamente significativa de $P<0.01$ en el grupo de intoxicación aguda evaluado a los 7 días. Esto es debido a que la glucosa plasmática a los 7 días tuvo una concentración ligeramente por encima del nivel control, pero la concentración en orina que presenta es casi el doble de la concentración de glucosa en orina del grupo control.

Analizar el manejo renal de creatinina. *Creatinina en plasma*, se observó un aumento en la concentración de creatinina con respecto al grupo control, encontrándose diferencia significativa de $P<0.01$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación aguda evaluado a los 28 días, así como una diferencia de $P<0.001$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación intermitente.

Creatinina en orina, se observa una disminución de la concentración de creatinina en los grupos de intoxicación aguda evaluados a los 7 y 14 días, sin embargo se ve un drástico aumento en el grupo de intoxicación aguda evaluado a los 28 días, al igual se observa un aumento de creatinina en el grupo de intoxicación intermitente. Se encontró diferencia significativa de $P<0.01$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación intermitente, también se ve una diferencia de $P<0.05$ entre el grupo de intoxicación aguda evaluado a los 28 días y el grupo control.

Aclaramiento de creatinina, se puede observar se presenta una marcada disminución del aclaramiento de la creatinina, existe una diferencia estadísticamente significativa de $P<0.01$ entre el grupo control y el grupo agudo evaluado a los 28 días y el grupo de intoxicación intermitente.

Los riñones son los principales eliminadores de aquellos productos de desecho metabólico que ya no son necesarios para el cuerpo, como son la urea (del

metabolismo de los aminoácidos), la creatinina (de la creatina muscular), el ácido úrico (de los ácidos nucleicos), los productos finales del metabolismo de la hemoglobina (como la bilirrubina) y los metabolitos de varias hormonas. Estos productos de desecho deben eliminarse del cuerpo tan rápidamente como se producen, es importante mencionar que si la concentración de la creatinina plasmática es elevada y en orina disminuida es un indicativo de daño renal (Eaton *et al*, 2006; Hall *et al*, 2011). La creatinina es principalmente filtrada para su eliminación, no se reabsorbe ni secreta, los resultados obtenidos a los 28 días de evaluación del grupo agudo y del grupo de intoxicación intermitente indican un aumento en la presencia de creatinina tanto en sangre como en orina, lo cual podría ser debido a aumento de producción de energía muscular.

Medir la actividad de la enzima TGG en orina. TGG en muestras de orina de grupos de intoxicación aguda e intermitente, así como en el grupo control, se puede observar un aumento en la actividad enzimática de esta enzima en el grupo agudo e intermitente. Se observa diferencia estadísticamente significativa de $P < 0.05$ entre el grupo control y el grupo de intoxicación intermitente (gráfica 15). Se ha encontrado que cuando las células de la fracción de los túbulos proximales mueren se liberan las enzimas que se encuentran en el borde en cepillo, entre ellas la TGG, la cual su actividad en la orina es un indicador de necrosis tubular en los tubos proximales (El-Sharkawy *et al*, 1994; Glossman *et al*, 1972), en este trabajo se muestra que tanto en el grupo agudo como en el intermitente se ve expresada esta enzima, siendo indicador de muerte celular por necrosis en las células del borde en cepillo.

Cuantificar las concentraciones de MDA en riñón como indicador de estrés oxidativo. MDA en riñones, obtenidos en las cirugías a diferentes tiempos, los resultados se presentan en la gráfica 16, se muestra un aumento en la concentración de MDA en todos los grupos de estudio, siendo más significativo en el grupo agudo evaluado a los 7 días; se puede observar que existe una diferencia estadísticamente significativa de $P \leq 0.001$ entre el grupo control y el grupo analizado a los 7 días.

El estrés oxidativo está involucrado en muchas enfermedades, tales como aterosclerosis, enfermedad de Parkinson, sensibilidad química múltiple, Alzheimer, entre otras, también es importante en el envejecimiento. Los radicales hidroxilo pueden modificar aminoácidos, hidratos de carbono, iniciar la peroxidación de lípidos, y oxidar nucleobases. Estos radicales libres atacan ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares y lipoproteínas y los transforman en ácidos grasos peroxidados, los cuales liberan Malondialdehído (MDA), de tal manera que la concentración de MDA, es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados y por lo tanto un buen indicador de peroxidación lipídica, hablando a nivel renal, el estrés oxidativo representa un aumento en el mecanismo de daño renal provocando nefropatías, esta lipoperoxidación compromete la membrana basal y epitelial, afectando las funciones del túbulo renal (Fina 2009; Heredia et al, 2012). Debido a esto se infiere que el aumento en la concentración de MDA encontrado en el homogéneo de riñón es indicativo de daño a las membranas celulares.

Cuantificar las concentraciones de GSH en riñón y plasma sanguíneo como indicador de la capacidad antioxidante. se observa una disminución en la concentración de GSH en el grupo de intoxicación aguda en los tiempos evaluados, sin embargo en el grupo de intoxicación intermitente se ve un aumento por arriba de la concentración del grupo control, no se observan diferencias significativas entre grupos (gráfica 17).

GSH obtenidos en muestras de plasma de los grupos de intoxicación aguda e intermitente comparados con el grupo control. Se puede observar una ligera disminución en la concentración de GSH en el grupo agudo evaluado a las 24 horas y los 7 días, así como un aumento a nivel del grupo control en el grupo agudo evaluado a los 14 y 28 días, también se observa en el grupo de intoxicación intermitente. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

El glutatión es un tripéptido que contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato.

El glutatión es un antioxidante que ayuda a proteger las células de especies reactivas de oxígeno. El glutatión funcionará como sustrato para la glutatión peroxidasa (GPx) y así reducir el peróxido de hidrógeno y lipoperoxidos (Fina, 2009; Cisneros, 1995)). Es decir al verse disminuido se considera ejerció su actividad como antioxidante, los resultados obtenidos no muestran cambios significativos, por lo que se intuye hubo algún error en la ejecución de la técnica.

Analizar los cambios estructurales de los riñones. Una vez realizados los cortes histológicos (5µm) y la tinción HE, se tomaron las fotografías al tejido más representativo de las laminillas, es decir aquel que no presentaba pliegues o rupturas causadas por la manipulación; se puede observar el tejido integral perteneciente al grupo control (a), edema celular, necrosis y desprendimiento celular hacia la luz tubular en el grupo agudo evaluado a las 24 horas (b), se observan tubos desnudos y pérdida celular en el grupo agudo evaluado a los 7 días (c), en el grupo agudo evaluado a los 14 días se puede observar necrosis celular con desprendimiento hacia la luz tubular así como tubos desnudos (d), en la laminilla del grupo agudo evaluado a los 28 días se observa reparación tubular, no presenta detritus en la luz tubular (e), se puede observar en el grupo de intoxicación intermitente regeneración tubular, necrosis tubular con desprendimiento hacia la luz tubular así como edema celular (f); los resultados se pueden observar en la figura 13. Lo encontrado por Chávez *et al* en 2010, coincide con los resultados obtenidos a las 24 horas de evaluación del grupo agudo. Los túbulos son vulnerables a agentes nefrotóxicos, estos también son susceptibles a presentar isquemia, esto es debido a que cuentan con una amplia superficie de reabsorción la cual cuenta con diferentes sistemas de transporte activo de iones y de ácidos orgánicos (Cotran et al, 1999). Es por esto que se puede observar como los túbulos proximales se ven afectados, mostrando señales de necrosis celular tales como edema, desprendimiento de células hacia la luz tubular, sin embargo, a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pesar de presentar un daño importante en el grupo agudo al pasar el tiempo se puede observar indicios de reparación tubular, por lo que se podría llegar a restablecer la integridad del epitelio celular. En el grupo de intoxicación intermitente a pesar de que fueron más dosis las administradas, también se puede observar una reparación del daño presente en los túbulos proximales. Es importante mencionar que la pérdida celular observada se ve relacionada con la actividad de la TGG en orina, como se observa anteriormente esta se ve exacerbada en comparación con el grupo control.

Cuantificar la concentración de TNF- α en plasma. Se realizó el análisis cuantitativo de TNF- α , sin embargo no se obtuvieron los resultados esperados, se puede observar en las columnas 1 y 2 la curva de estandarización (duplicado), se observa la celda 6E color, sin embargo las muestras se colocaron por triplicado y al no observar un indicio de color en las celdas 6D y 6F se consideró contaminación (figura 14). Esto podría ser resultado de una desnaturalización del TNF- α , esto debido a que las muestras estuvieron varios meses en ultracongelación (-80°C) en espera de la llegada del reactivo.

9. CONCLUSIONES

- ❖ La administración de las NPSTiO₂ provocó cambios en la filtración glomerular, en el grupo agudo se observó un aumento durante los primeros 14 días de evaluación y una drástica disminución al día 28 de evaluación. En el grupo de intoxicación intermitente causó una disminución de este.
- ❖ La administración de las NPSTiO₂ provocó alteraciones al Flujo Plasmático Renal, causando una disminución de este en ambos grupos de investigación.
- ❖ Se infiere la activación del mecanismo compensatorio de renina-angiotensina-aldosterona en ambos grupos, causando oliguria.
- ❖ La administración de las NPSTiO₂ alteró el transporte de Na, por lo que se infiere daño en los túbulos proximales de las nefronas, debido a que no se llevó a cabo la reabsorción de este.
- ❖ Las NPSTiO₂ causan hiperglucemia dentro de las primeras 24 horas de administración.
- ❖ Se observó glucosuria en ambos grupos de investigación.
- ❖ Los niveles de creatinina en plasma y en orina se vieron incrementados en ambos grupos intoxicados con las NPSTiO₂.
- ❖ La enzima TGG presentó mayor actividad en el grupo de intoxicación intermitente, indicando mayor pérdida en las células proximales.
- ❖ La presencia de MDA se vio aumentada en ambos grupos intoxicados por las NPSTiO₂, siendo significativa en el grupo agudo evaluado a los 7 días posteriores de la administración.
- ❖ La prueba cuantitativa de GSH no fue concluyente.
- ❖ La evidencia histológica muestra que una sola dosis de estas NPSTiO₂ causan edema celular, necrosis, desprendimiento de células en túbulos proximales, sin embargo después de 28 días de la intoxicación se observa una regeneración de estas células tubulares. En el grupo de intoxicación intermitente se observó necrosis en células tubulares, desprendimiento a la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

luz tubular, edema; sin embargo también se observó reparación tubular. Esto confirmo los resultados obtenidos en parámetros como PAH, glucosa, sodio y TGG al mostrar la pérdida de las células del borde en cepillo.

- ❖ El análisis cuantitativo de $\text{TNF-}\alpha$ no fue concluyente debido a la posible desnaturalización de la proteína.



10. BIBLIOGRAFÍA

- ⌚ Agencia de Protección Ambiental de EEUU. Exposure assessment tools by chemical classes- Nanomaterials (2016). EPA ExpoBox. Disponible en: <https://www.epa.gov/expobox/exposure-assessment-tools-chemical-classes-nanomaterials> Fecha consulta: 13 de mayo de 2017.
- ⌚ American Chemistry Council (ACC). (2017). Dióxido de Titanio. Disponible en: <https://www.chemicalsafetyfacts.org/es/dioxido-de-titanio/#safety-information> Fecha consulta: 19 de mayo de 2017.
- ⌚ Arendhorst W.J. (1975). Autorregulation of blood flow in the rat kidney. *Am Physiol*, 228, pp 127-133.
- ⌚ Bartels H.; Böhmer M. (1971). Eine mikromethode zur kreatininbestimmung. *Clin Chim acta* 1971. Vol 32, pp 82-85.
- ⌚ Borella M.; Varela Q. (2004). Antioxidantes enzimáticos. En: Radicals libres e a resposata celular ao estresse oxidativo. Editora ULBRA. Pp: 35-49.
- ⌚ Burckhardt G.; Bahn A.; Wolff N.A. (2001). Molecular physiology of renal p-Aminohippurate Secretion. *News Physiology Sci*. Volume 16, pp 114-118.
- ⌚ Chávez Morales R.M; Jaramillo Juárez F. (2010). Análisis del efecto del *Ginkgo biloba* sobre el daño funcional y bioquímico producido por el tetracloruro de carbono en hígado y en riñones. Tesis doctorado UAA, pp 60-99.
- ⌚ Ciencias Biológicas y Educación para la Salud. (2008). Anatomía y fisiología del sistema renal. Disponible en: http://hmmcbiol.blogspot.com/2008/01/anatomia-y-fisiologia-del-sistema_21.html Fecha de consulta: 13 de Noviembre de 2017.
- ⌚ Cisneros P.E. (1995). La glutathion reductasa y su importancia biomédica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 14(1) Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001995000100003&lng=es&tlng=es. Fecha de consulta: 20 de mayo de 2019.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ☉ Cohn V.H.; Lyle J. (1966). A fluorometric assay for glutathione. Anal Biochem, 14 (3), pp 434-440.
 - ☉ Cotran R.; Kumar V.; Collins T. (1999) Robbins Patología estructural y funcional. Mc Graw Hill- Interamericana, 6th edición, pp 971-1036.
 - ☉ Cornejo L. (2015). Algunas de las principales nanopartículas y sus propiedades. Nuevas tecnologías y materiales. Disponible en: <http://nuevastecnologiasymateriales.com/algunas-de-las-principales-nano-particulas-y-sus-propiedades/> Fecha consulta: 06 de mayo de 2017.
 - ☉ Cornejo L. (2015). Clasificación nanomateriales. Nuevas tecnologías y materiales. Disponible en: <http://nuevastecnologiasymateriales.com/clasificacion-de-los-nano-materiales/> Fecha consulta: 06 de mayo de 2017.
 - ☉ Corrales L.; Muñoz M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Ciencias Biomédicas. Volumen 10, núm. 18, pp 135-250.
 - ☉ Delgado G. (2009). Nanotecnología y producción de alimentos: impactos económicos, sociales y ambientales. Estudios Sociales 17(34): pp 186-205.
 - ☉ Díaz A.; Villegas O.; Castro L.A.; Treviño S.; Carmona G.G.; González C.M.A.; Moreno R.J.A.; (2013). Estudios preliminares sobre la actividad hipoglucémica y antihiperlipidémica de nanomatrices de TiO₂ con extracto de *Stevia rebaudiana bertonii* en ratas diabéticas inducidas con aloxano. REv. Mex. Cienc. Farm, volumen 44 (4), pp36-42.
 - ☉ Eaton D.C.; Pooler J.P. (2006) Fisiología Renal de Vander. Mc. Graw-Hill Interamericana. Sexta edición, pp 14-44.
 - ☉ El-Sharkawy A.M.; Abdel-Rahman S.Z.; Hassan A.A.; Gabr M.H.; El-Zoghby S.M.; El-Sewedy S.M. (1994). Biochemical effects of some insecticides on the metabolic enzymes regulating glutathione metabolism. Bull Environ Contam Toxicol (52), pp 505-510.
 - ☉ Escárcega González C.E.; Reynoso Andeola I.G.; Jaramillo González F.; Martínez Ruvalcaba H.; Posadas del Río F.A. (2016). The *Ginkgo biloba*

Extract Reverses the Renal Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Adult Male Rats. Biochemistry Research International Volume 2016, pp 5.

- ☉ Esterbauer H.; Cheeseman KH. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol (186), pp 407-421.
- ☉ Fabian E.; Landsiedel R.; Ma-Hock L.; Wiench K.; Wohlleben W.; Ravenzwaay B. (2008). Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. Arch toxicol. Volumen 28, pp 151-157.
- ☉ Fabiny DL.; Ertingshausen G. (1971). Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine whit CentrifChem. Clin Chem 1971. Vol. 17, pp 696-700.
- ☉ Feltrin J.; Sartor M.N.; De Noni A.; Bernardin A. M.; Hotza D.; Labrincha J. A. (2013). Superfícies fotocatalíticas de titânia em substratos cerâmicos. Parte I: Síntese, estrutura e fotoatividade. Cerâmica volumen 59, pp 620-632.
- ☉ Fina B. (2009). Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral Facultad Cs. Médicas. UNR. Rosario, Argentina. Disponible en: <http://www.biologiaosea.com.ar/files/seminarios/sem%20estres%20oxidativo.pdf> Fecha de consulta: 13 de Abril de 2019
- ☉ Franco G.M.; Gabriel N.L.; Herrera A.J.; Bell D. (1992). Mecanismos de regulación de la filtración glomerular: sistema retroalimentario tubuloglomerular, aspectos fisiológicos y su participación en la fisiopatología de enfermedades renales. Trabajo de ingreso Dra. Martha Franco Guevara; pp 139-141.
- ☉ Frejo Ma. T.; Díaz Ma. J.; Lobo M.; García J.; Capó M. (2011). Nanotoxicología ambiental: retos actuales. Medicina Balear, Volumen 26, núm. 2, pp 36-46.
- ☉ Fürer J. (1995). Eine einfache colorimetrische methode zur inulinbestimmung fuer Nieren-Clearance untersuchungen bei stoffwechselgesunden und diabetikern. Klin Wschr, 33, pp 729-730.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ☉ Glossmann H.; Neville D.M. (1972). Γ -Glutamyltransferase in kidney brush border membranes. Febs letters, volume 19 (4), pp 340-344.
 - ☉ Gómez A. (2014) Fisiología II, Fisiología renal. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/239442302/fisiologia-renal-pdf> Fecha consulta: 07 mayo de 2017.
 - ☉ Gutiérrez-Wing C. E. (2006). Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial. El Inin hoy, Contacto nuclear: pp 24-29.
 - ☉ Gutiérrez D.; Jos A.; Pichardo S.; Puerto M.; Sánchez E.; Grilo A.; Cameán AM. (2009). Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas. Revista de Toxicología. Volumen 26, pp 87-92.
 - ☉ Gutiérrez J. (2002). Daño oxidativo, los radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana Medicina Militar. Volumen 21, núm. 2, pp 126-133.
 - ☉ Hall J. E.; Guyton A. C. (2011) Guyton & Hall. Tratado de fisiología médica. Elsevier, 12ava Edición. Unidad V, Capítulo 26, pp 306.
 - ☉ Hasan T.; Geyikog L. (2007). An in vitro blood culture for evaluating the genotoxicity of titanium dioxide: the responses of antioxidant enzymes. Toxicology and industrial health. Volumen 23, núm. 7, pp 19-23.
 - ☉ He L.; Cai Y.; Chen Z.H.; Jiang J.M.; Wang N.S. (2006). Alteration of renal hemodynamic in adriamycin induced nephrosis rats administered with Wulingsan. Zhongguo Zhong Yao Zao Zhi, 31(16), pp 1358-1360.
 - ☉ Heredia R. D.; Fernández C. D.; Alfonso R. J.; Ballesteros H. M. (2012). El estrés oxidativo en la insuficiencia renal asociada con hipertensión. Revista Cubana de plantas medicinales. 31 (1): 16-25.
 - ☉ Hernando Avendaño L; Aljama García P.; Arias Rodríguez M.; Caramelo Díaz C.; Egido de los Rios J.; Lamas Peláez S. (2008). Nefrología clínica. Editorial Médica Panamericana, 3er. Edición. Capítulo 1, pp 3-18.
 - ☉ Hernando Grande A. (2007). Nanotecnología y nanopartículas magnéticas: la física actual en lucha contra la enfermedad. Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Física y Naturales. España. Vol. 101, Nº. 2, pp 321-327.
 - ☉ IARC, Agencia Internacional de Investigación para el Cáncer. (2011). Monografías sobre la evaluación de los riesgos carcinogénicos para los

seres humanos. Disponible en:
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol93/mono93-7.pdf> Fecha
consulta: 08 de mayo de 2017.

- ⑧ INSHT, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo (2010). Ficha internacional de seguridad química, Dióxido de Titanio. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España. Disponible en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/301a400/nspn0338.pdf> Fecha consulta: 08 de mayo de 2017.
- ⑧ Jamison R.L.; Hall D.A. (1983) The renal excretion of urea. En: Massry SG, Glasscock R, editors. Textbook of nephrology. Baltimore, Hong-Kong, London, Sydney; pp. 1.51-1.52
- ⑧ Kehrer J. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit. Rev. Toxicol. Núm. 23, pp 21-48.
- ⑧ Koeneman B.; Zhang Y.; Westerhoff P.; Chen Y.; Crittenden J.; Capco D. (2010). Toxicity and celular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. Cell Biol. Toxicology. Volumen 26, pp 225-238.
- ⑧ Long T.; Tajuba J.; Sama P.; Saleh N.; Swartz C.; Parker J.; Hester S.; Lowry G.; Veronesi B. (2007). Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia y damages neurons in vitro. Environmental Health Perspective. Volumen 115, núm. 11, pp 1631-1634.
- ⑧ Lozada S.; García L. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes: como mantener el equilibrio. Rev. Asociación Colombiana de Dermatología. Volumen 17, pp 172-179.
- ⑧ Mather A.; Pollock C. (2011). Glucose handling by the kidney. International Society of nephrology, volumen 79 (120), pp 51-56.
- ⑧ Medina M.; Galván L.; Reyes R. (2015). Las nanopartículas y el medio ambiente. Universidad, Ciencia y Tecnología. Vol. 19, núm. 74, pp 49-58.
- ⑧ Meneghini R. (1987). A toxicidade do oxigenio. Ciencia Hoje, pp 57-62.
- ⑧ Morrissey P.; O'Brien N. (1998). Dietary antioxidants in health and disease. Int. Dairy J. Núm. 8, pp 463-472.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ☉ Naghdi Gheshlaghi Z.; Hossein Riazi G.; Ahmadian S.; Ghafari M.; Mahinpour R. (2008). Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta Biochim Biophys Sin.* Pp 777-782.
 - ☉ Orłowski M.; Meister A. (1963). γ -Glutamyl-p-nitroanilide a new convenient substrate for determination of the L-and-D γ -glutamyltranspeptidase activities. *Biochim Biophys Acta*, 73, pp 679-681.
 - ☉ Paull W.; Wolfe P.; Herbert P.; Sinkula M. (2003). Investing in nanotechnology. *Nature Biotechnology* 21 (10), pp 1144-1147.
 - ☉ Perón J.; López J.; López T. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana Medicina Militar*. Volumen 30, núm. 1, pp 15.
 - ☉ Pourova J.; Kottova M.; Voprsalova M.; Pour M. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta physiol* 198. pp 15-35.
 - ☉ Proyecto Biosfera (2013), Ministerio de Educación, Gobierno de España. Disponible en: http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/3ESO/aparato_circulatorio/contenidos10.htm. Fecha de consulta: 24 de abril de 2017.
 - ☉ Puyol M.R.; Marqués M.L.R.; López J.J.V.; Puyol D.R. (2010). Biomarcadores en el diagnóstico de las patologías renales. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. pp 369-414.
 - ☉ QuimiNet. (2006)¿Para qué se usa el Dióxido de Titanio? Disponible en: <https://www.quiminet.com/articulos/para-que-se-usa-el-dioxido-de-titanio-5346.htm> Fecha consulta: 08 de mayo de 2017.
 - ☉ Ramón G. (2006). Sistema Renal Y Actividad Física Conocimiento Corporal IV. Instituto Universitario de Educación Física, Universidad de Antioquia, pp 2-15.
 - ☉ Sager T.; Kommineni C.; Castranova V. (2008). Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface área. *Part Fibre Toxicol*. Volúmen 5, núm. 17.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ☉ Shi H.; Magaye R.; Castranova V.; Zhao J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Particle and fibre toxicology. Volumen 10, núm. 15, pp 1-33.
 - ☉ Srivastaba R.; Rahman Q.; Kashyap A.; Singh A.; Jain G.; Jahan S.; Lohani M. (2013). Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cáncer cell linia, A549. Volumen 32, núm. 2, pp 153-166.
 - ☉ Szablewski L. (2017). Distribution of glucose transporters in renal diseases. Jorunal of biomedical science, volumen 24 (64), pp 1-12.
 - ☉ Tetteh Myra, colaboradores del Grupo de Enlace Comunitario y Educación. (2012). ¿Qué es el estrés oxidativo?. Environmental Health Fact Sheet. pp 1-2.
 - ☉ Thureau K.; Boylan J.W. (1976) Acute renal success. The unexpected logic of oliguria in acute renal failure. American Journal of Medicine, volumen 61; pp 308-315
 - ☉ Tietz N. W. *et al.* (1995) Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd edition. AACC.
 - ☉ Trinder P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann Clin Biochem. Vol. 6: pp 24-33.
 - ☉ Triplitt C.L. (2012) Understanding the kidneys role in blood glucose regulation. The American Journal of managed care, volumen 18 (1), pp 11-16.
 - ☉ Türkez H.; Geyikog'lu F. (2007). An in vitro blood culture for evaluating the genotoxicity of titanium dioxide: the reponses of antioxidant enzymes. Toxicology and industrial health. Volumen 23, pp 19-23.
 - ☉ Venkatesh S.; Schrier R.W.; Andreoli T.T. (1998). Mechanisms of tubular sodium chloride transport. Renal Failure Volume 20 (6); pp783-799.
 - ☉ Yu P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiological Reviews. Volumen 74, núm. 1, pp 139-162.
 - ☉ Zahra N.; Gheshlaghi G.; Hossein R.; Shahin A.; Mahmoud G.; Roya M. (2008). Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. Volumen 40, núm. 9, pp 777-780.