



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTOS DE QUÍMICA/FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

TESIS

“EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS ÓXIDOS METÁLICOS TiO_2 , $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$, NANOESTRUCTURADOS *IN VITRO* E *IN VIVO*”

PRESENTA

CRISTINA PATRICIA ROMO BERNAL

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN TOXICOLOGÍA

COMITÉ TUTORAL

DRA. ILIANA E. MEDINA RAMÍREZ

DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ

DRA. HAYDEÉ MARTÍNEZ RUVALCABA

Aguascalientes, Ags., 22 de Septiembre de 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

L.A.Q.B. CRISTINA PATRICIA ROMO BERNAL
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Romo:

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: "Evaluación de la toxicidad de los óxidos metálicos TiO₂, TiO₂-Ag y TiO₂-Fe⁺³, nanoestructurados *in vitro* e *in vivo*", 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., 22 de septiembre de 2014
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente, en mi calidad de tutor designado de la **L.A.Q.B Cristina Patricia Romo Bernal** con ID 576 quien realizó la tesis titulada: **“EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS ÓXIDOS METÁLICOS TiO_2 , TiO_2-Ag y TiO_2-Fe^{+3} , NANOESTRUCTURADOS *IN VITRO* E *IN VIVO*”**, y con fundamento en el Artículo 175, apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir **VOTO APROBATORIO**, para que la alumna pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención de grado.

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

ATENTAMENTE

Dra. Iliana Ernestina Medina Ramírez

Aguascalientes, Ags., a 17 de Septiembre de 2014

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



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

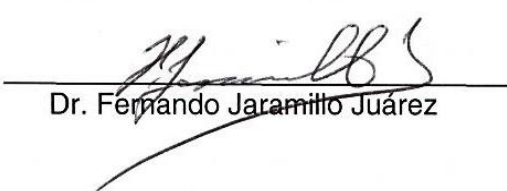
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente, en mi calidad de tutor designado de la **L.A.Q.B Cristina Patricia Romo Bernal** con ID 576 quien realizó la tesis titulada: **“EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS ÓXIDOS METALICOS TiO_2 , TiO_2-Ag y TiO_2-Fe^{+3} , NANOESTRUCTURADOS *IN VITRO* E *IN VIVO*”**, y con fundamento en el Artículo 175, apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir **VOTO APROBATORIO**, para que la alumna pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención de grado.

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

ATENTAMENTE



Dr. Fernando Jaramillo Juárez

Aguascalientes, Ags., a 17 de Septiembre de 2014

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



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente, en mi calidad de miembro del comité tutorial de la **L.A.Q.B Cristina Patricia Romo Bernal** con ID 576 quien realizó la tesis titulada: **“EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS ÓXIDOS METÁLICOS TiO_2 , TiO_2-Ag y TiO_2-Fe^{+3} , NANOESTRUCTURADOS *IN VITRO* E *IN VIVO*”**, y con fundamento en el Artículo 175, apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir **VOTO APROBATORIO**, para que la alumna pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención de grado.

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

ATENTAMENTE

Dra. Haydee Martínez Ruvalcaba

Aguascalientes, Ags., a 17 de Septiembre de 2014

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

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Martha Bernal, Gracias por ser mi ejemplo de vida, mi ángel, inspiración, guía, confidente y amiga incondicional. Gracias por enseñarme que no hay nada tan grande que no pueda alcanzar, ni nada tan pequeño que no deba valorar. Me has mostrado que los logros se construyen paso a paso y que por más hostil que sea el camino siempre estará Dios guiándonos y dándonos la fortaleza, coraje y sabiduría necesaria para afrontar las adversidades y lograr nuestros objetivos. Gracias por alentarme y apoyarme en cada sueño y aventura loca de mi vida. Mil gracias por tu apoyo y amor incondicional.

A mis hermanas y amigas, Eva y Cecilia Romo. Ustedes son otro gran ejemplo de vida, profesionalismo, lucha, entrega y determinación. Gracias por apoyarme, alentarme y ser mi hombro en los malos y muy buenos momentos de mi vida. A mi sobrina, Regina Barreiro, la cual ha traído a la familia una gran felicidad y ha aumentado el amor y unión familiar.

Gracias a mi comité tutorial por compartir un poco de su enorme conocimiento para poder culminar este trabajo que con mucho esfuerzo y dedicación se llevó a cabo por más de un 1 año. A la Dra. Iliana Medina Ramírez, por sus enseñanzas, confianza, dedicación, amistad y miles de conocimientos compartidos. Gracias Doctora por alentarme a luchar por mis sueños y enseñarme que cualquier cosa que se haga, se tiene que hacer con ganas, esfuerzo, dedicación y mucho corazón. Así también por mostrarme que si se quiere ser alguien y hacer algo en la vida no hay pretextos, sólo ganas de hacer las cosas y hacerlas bien. Gracias por confiar y creer en mí. Al Dr. Fernando Jaramillo Juárez por sus invaluable consejos, apoyo y dedicación. Toda una vida de experiencia y buen trabajo habla por sí sólo. Gracias por permitirme ser su estudiante y empaparme un poco de su gran conocimiento. A la Dra. Haydee Martínez Ruvalcaba por sus consejos y comentarios para poder llevar a cabo este trabajo de tesis.

A la Dra. María Consolación Martínez Saldaña, Dr. Javier Ventura y M. en C. Héctor Araiza por su apoyo invaluable y facilidades para la realización de mi tesis. De todo corazón mil gracias.

Al IPICYT, especialmente al Dr. José Luis Rodríguez por brindarme la facilidad de realizar parte de mi investigación en su laboratorio.

A mis Amigos: Tania Moncada, Nayeli Rodríguez, Diana de Lira, Rigoberto Santoyo, Oscar Ramírez por su incondicional apoyo, comprensión, oídos, paciencia y mucho amor en el transcurso de la tesis. Gracias por levantarme y tolerarme en mis momentos de debilidad. Gracias por estar siempre y ser parte de mí y mi familia.

A mis amigos y compañeros de maestría, Axel Huerta, Carlos Encarnación, y Gladys. Gracias por haberme tenido la paciencia necesaria, por apoyarme y motivarme a seguir adelante en estos dos años.

Al CONACYT por permitirme realizar uno de mis más grandes sueños, realizar una Maestría, a través de su apoyo económico y facilidades para la realización de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	1
INDICE DE TABLAS.....	6
INDICE DE FIGURAS.....	7
ACRÓNIMOS.....	9
RESÚMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
I.1. ORIGEN DE LAS NANO-PARTÍCULAS.....	14
I.2. NANO-CIENCIA.....	15
I.3. NANO-TECNOLOGÍA.....	15
I.3.1. CLASIFICACIÓN DE LAS NPs.....	16
I.3.1.1. ORGÁNICOS:.....	16
I.3.1.2. FULLERENOS.....	16
I.3.1.3. NANOTUBOS DE CARBONO:.....	17
I.3.1.4. GRAFITO:.....	17
I.3.1.5. INORGÁNICOS:.....	17
I.3.1.6. ÓXIDOS METÁLICOS:.....	17
I.3.1.7. METALES:.....	18
I.3.1.8. PUNTOS CUÁNTICOS:.....	18
I.3.1.9. POLÍMEROS:.....	18
I.3.1.10. DENDRÍMEROS.....	18
I.3.1.11. BASADAS EN LÍPIDOS.....	19
I.3.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS.....	19
I.3.2.1. PROCESO SOL-GEL.....	20
I.3.2.2. MÉTODO COLOIDAL.....	21
I.3.2.3. REDUCCIÓN FOTOQUÍMICA Y RADIOQUÍMICA.....	21

I.3.2.4.	IRRADIACIÓN CON MICROONDAS.....	21
I.4.	NANO-TOXICOLOGÍA	22
I.4.1.	PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	23
I.4.2.	NANO-PARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO (TiO ₂).....	25
I.4.2.1.	FOTOCATALISIS DEL TiO ₂	25
I.4.2.2.	VÍAS DE EXPOSICION A TiO ₂ - NPs.....	28
I.4.2.3.	VIA RESPIRATORIA.....	28
I.4.2.4.	VIA ORAL	29
I.4.2.5.	VÍA DÉRMICA	30
I.4.3.	PRUEBAS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	30
I.4.3.1.	PRUEBA DE HEMÓLISIS.....	31
II.	ANTECEDENTES	35
II.1.	EFFECTOS ADVERSOS DE TiO ₂ -NPS	35
II.1.1.	EXPOSICIÓN DÉRMICA	35
II.1.2.	EXPOSICIÓN INHLATATORIA	36
II.1.3.	EXPOSICIÓN ORAL.....	36
II.1.4.	ABSORCIÓN DE TiO ₂ - NPS	37
II.2.	PRINCIPALES MECANISMOS DE NANO-TOXICIDAD	38
II.2.1.	FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)	39
II.2.2.	REACCIÓN DE FENTON	40
II.2.3.	ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNE.....	40
II.2.4.	DAÑO MITOCONDRIAL.....	41
II.2.5.	CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE TiO ₂ -NPs	42
II.2.6.	LIXIVIACIÓN DE IONES EN SOLUCIÓN	43
II.3.	COMPLEJIDAD DE LA EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE LAS NPs	44
III.	JUSTIFICACIÓN.....	49
IV.	HIPÓTESIS.....	51

V. OBJETIVO GENERAL	51
VI. OBJETIVO ESPECIFICOS.....	51
VII. METODOLOGÍA	52
VII.1. SÍNTESIS DE NANO-PARTÍCULAS	52
VII.1.1. SÍNTESIS DE DIÓXIDO DE TITANIO (TiO ₂)	52
VII.1.2. SÍNTESIS DE DIÓXIDO DE TITANIO DOPADO CON Fe ⁺³ (TiO ₂ -Fe ⁺³)	52
VII.1.3. SÍNTESIS DE DIÓXIDO DE TITANIO DOPADO CON PLATA (TiO ₂ -Ag)	53
VII.2. CARACTERIZACIÓN.....	54
VII.3. PRUEBA <i>IN VITRO</i> :.....	54
VII.3.1. PRUEBA DE HEMÓLISIS	54
VII.3.2. ACTIVIDAD HEMOLÍTICA	56
VII.3.3. CONCENTRACIÓN DE IONES EN SOLUCIÓN	56
VII.3.4. INTERACCIÓN DE LAS CELULAS ROJAS CON TiO ₂ -Ag POR SEM.....	56
VII.4. PRUEBA <i>IN VIVO</i> :	57
VII.4.1. PRUEBA AGUDA	57
VII.4.2. PRUEBA SUB-AGUDA	57
VII.4.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE HÍGADO.....	58
VII.4.3.1. ALBÚMINA EN PLASMA.....	58
VII.4.3.2. PROTEÍNAS TOTALES EN SUERO	59
VII.4.3.3. BILIRRUBINAS EN SANGRE	60
VII.4.3.4. ACTIVIDAD SÉRICA DE TGO/AST	60
VII.4.3.5. ACTIVIDAD SÉRICA DE TGP/ALT	61
VII.4.3.6. ACTIVIDAD SÉRICA DE FOSFATASA ALCALINA.....	62
VII.4.4. PRUEBAS HISTOLÓGICAS EN HÍGADO	62
VII.4.4.1. FUNDAMENTO.....	62
VII.4.5. PRUEBAS INMUNOLÓGICAS	63
VII.4.5.1. INTERLEUCINA 2 (IL-2):.....	63

VII.4.5.2.	INTERLEUCINA 6 (IL-6):.....	64
VII.4.5.3.	INTERLEUCINA 10 (IL-10):.....	64
VII.4.5.4.	INTERFERÓN GAMA (INF- γ):	64
VII.4.5.5.	FACTOR DE NECROSIS TUMORL (TNF- α).....	65
VII.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	65
VIII.	RESULTADOS.....	67
VIII.1.	NANO-MATERIALES.....	67
VIII.2.	CARACTERIZACIÓN.....	67
VIII.3.	PRUEBAS <i>IN VITRO</i>	70
VIII.3.1.	PRUEBA DE HEMÓLISIS.....	70
VIII.3.2.	ACTIVIDAD HEMOLÍTICA	75
VIII.3.3.	MATERIALES SEGUROS NO HEMOLÍTICOS.....	78
VIII.3.4.	ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS NMs (1.0 mg/mL).....	78
VIII.3.5.	TiO ₂ -Ag.....	79
VIII.3.6.	CONCENTRACIÓN DE IONES EN SOLUCIÓN	82
VIII.3.7.	CORRELACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA Y LA CONCENTRACIÓN DE IONES	82
VIII.3.8.	INTERACCIÓN DE LAS CÉLULAS ROJAS CON TiO ₂ -Ag.....	86
VIII.4.	PRUEBAS <i>IN VIVO</i>	89
VIII.4.1.	PRUEBA AGUDA.....	89
VIII.4.1.1.	PESO CORPORAL.....	89
VIII.4.1.2.	PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPÁTICO.....	90
VIII.4.2.	PRUEBA SUB-AGUDA	94
VIII.4.2.1.	PESO CORPORAL.....	94
VIII.4.2.2.	PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPÁTICO. PRUEBA SUB-AGUDA	95
VIII.4.2.3.	ANÁLISIS HISTOLÓGICO EN HÍGADO.....	98

VIII.4.3. CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS EN SANGRE..... 101

IX. DISCUSIONES 105

X. CONCLUSIONES..... 123

GLOSARIO 124

BIBLIOGRAFIA 129

ANEXOS 145



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Efectos *in vivo* de las Nano-partículas 43

Tabla 2: Estudios *In vivo* e *in vitro* de la toxicidad de TiO₂-NP 45

Tabla 3: Parámetros bioquímicos para la determinación de daño en hígado 58

Tabla 4: Ancho de Banda prohibida de los nano-materiales TiO₂ y TiO₂-Fe⁺³ 68

Tabla 5: Determinación de potencial zeta y radio hidrodinámico..... 70

Tabla 6. Concentración de los NMs que causa el 2% de lisis de los eritrocitos..... 78

Tabla 7: Concentración de plata total (ppm) en el NMs 82

Tabla 8: Peso corporal de las ratas Wistar. Prueba aguda..... 89

Tabla 9. Pruebas de funcionamiento hepático. Prueba aguda 91

Tabla 10. Peso corporal de las ratas Wistar. Prueba sub-aguda..... 94

Tabla 11: Pruebas de funcionamiento hepático. Prueba sub-aguda..... 95

Tabla 12: Niveles séricos de IL-2, .IL-6, IL-10 y INF- γ . Prueba aguda 103

Tabla 13: Niveles séricos de IL-6, IL-10, y TNF- α . Prueba sub-aguda..... 104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Posibles rutas de exposición a nano-partículas.	14
Figura 2: Escala nano-métrica.....	16
Figura 3: Richard Feymman. Físico y padre de la nano-tecnología.....	16
Figura 4: Clasificación de NPs	19
Figura 5: Degradación y absorción de TiO ₂ -NPs tras la irradiación de luz UV	26
Figura 6. Posibles mecanismos de interacción de las NPs con los tejidos biológicos ..	39
Figura 7: Variables utilizadas <i>in vitro</i>	55
Figura 8: Evaluación de la toxicidad de NPs <i>in vitro</i> en células rojas humanas	55
Figura 9. Nano-materiales sintetizados.....	67
Figura 10. Caracterización de nano-partículas por TEM y EDX.....	67
Figura 11: Caracterización de nano-partículas por SEM.....	68
Figura 12: Caracterización de nano-partículas por XRD	69
Figura 13: Determinación de potencial zeta y radio hidrodinámico.....	70
Figura 14: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por TiO ₂	71
Figura 15: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por TiO ₂ Aldrich	72
Figura 16: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO ₂ -Fe ⁺³ 1%...	72
Figura 17: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO ₂ -Fe ⁺³ 3%...	73
Figura 18: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO ₂ -Fe ⁺³ 5%...	73
Figura 19: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO ₂ - Ag 0.5%..	74
Figura 20: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO ₂ -Ag 1.5% ..	74
Figura 21: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO ₂ -Ag 2.5% ..	75
Figura 22: Determinación de la actividad hemolítica <i>in vitro</i> a concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/mL de TiO ₂	76
Figura 23: Determinación de la actividad hemolítica <i>in vitro</i> a concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/mL de TiO ₂ -Fe ⁺³	76
Figura 24: Determinación de la actividad hemolítica <i>in vitro</i> a concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/mL de TiO ₂ -Ag	77
Figura 25. Porcentaje de hemólisis a 1.0 mg/mL de los NMs	79
Figura 26: Comparación de la actividad hemolítica de los diferentes dopajes de TiO ₂ -Ag.....	80

Figura 27: Concentración que ocasiona el 50% de lisis en las diferentes variables utilizando los tres dopajes de TiO₂-Ag.....81

Figura 28: Evaluación del porcentaje de plata que sufre lixiviación del material TiO₂-Ag83

Figura 29: Correlación entre la actividad hemolítica y los iones Ag⁺ en solución TiO₂-Ag 0.5%84

Figura 30: Correlación entre la actividad hemolítica y los iones Ag⁺ en solución TiO₂-Ag 1.5%85

Figura 31: Correlación entre la actividad hemolítica y los iones Ag⁺ en solución TiO₂-Ag 2.5%86

Figura 32. Daño de la membrana celular de las células rojas humanas.....87

Figura 33. Análisis por SEM y EDS de células rojas humanas con TiO₂-Ag88

Figura 34. Peso corporal de ratas Wistar machos. Prueba aguda.....89

Figura 35. Pruebas bioquímicas de funcionamiento hepático. Prueba aguda.....93

Figura 36. Peso corporal de ratas Wistar machos. Prueba Sub-aguda94

Figura 37. Pruebas bioquímicas de funcionamiento hepático. Prueba sub-aguda.....98

Figura 38. Análisis histológico de hígado (H&E). Prueba aguda.....99

Figura 39. Análisis histológico de hígado (H&E). Prueba Sub-aguda100

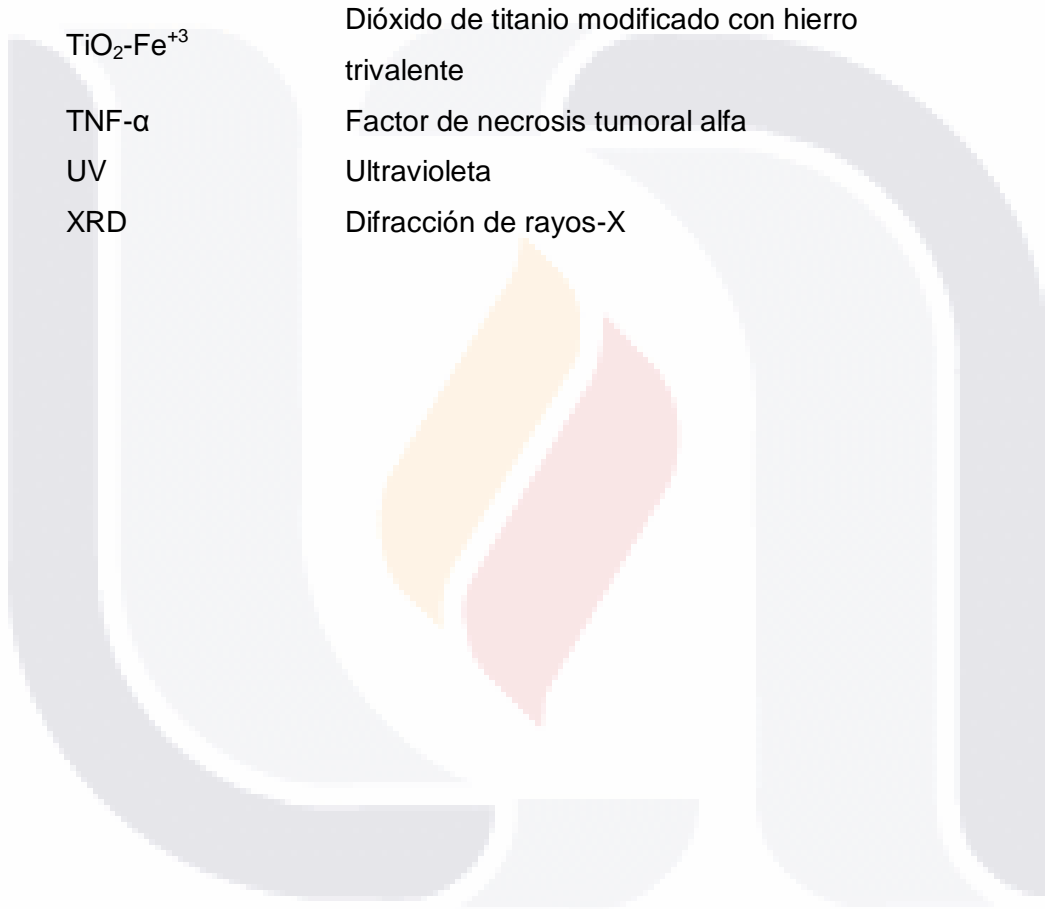
Figura 40: Niveles séricos de IL-2, IL-6, IL-10 y INF- γ . Prueba aguda.....102

Figura 41: Niveles séricos de interleucinas día 14 de tratamiento. Prueba aguda.....103

Figura 42: Niveles séricos de IL-6, IL-10, y TNF- α . Prueba sub-aguda104

ACRÓNIMOS

Ag-NPs	Nano-partículas de plata
Alb	Albúmina
ALKP	Fosfatasa alcalina
ALT/TGP	Alanino aminotransferasa
AST/TGO	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosin trifosfato
BD	Bilirrubina directa
BI	Bilirrubina indirecta
BT	Bilirrubina total
EDX	Espectrofotometría de energía dispersiva
Eg	Ancho de banda prohibida
ELISA	Análisis de Inmunoabsorción ligado a enzimas
EPA	Agencia del medio ambiente de EUA
Glob	Globulinas
GSH	Glutación reducido
h ⁺ /e ⁻	par hueco/electrón
HNO ₃	Ácido Nítrico
IL	Interleucina
INF-γ	Interferón gama
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MWCNT	Nanotubo de carbono de pared múltiple
NK	Células citocidas naturales
NMs	Nano-materiales
NO	Óxido Nítrico
NPs	Nano-partículas
O ₂ ⁻	Radical superóxido
Obs	Obscuridad
OH ⁻	Radical hidroxilo
PT	Proteínas totales
RBC	Glóbulos rojos lavados
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SC	Sangre completa



SEM	Microscopia electrónica de barrido
SSF	Solución salina fisiológica
SWCNT	Nanotubo de carbono de pared única
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
Th1	célula T colaboradora 1
Th2	célula T colaboradora 2
TiO ₂	Dióxido de titanio
TiO ₂ -Ag	Dióxido de titanio modificado con plata
TiO ₂ -Fe ⁺³	Dióxido de titanio modificado con hierro trivalente
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Ultravioleta
XRD	Difracción de rayos-X

RESÚMEN

La “Nano-tecnología” es la ciencia que se encarga de estudiar y aplicar materiales que poseen al menos una de sus tres dimensiones en el rango nano-métrico (1-100 nm). El TiO_2 es uno de los principales compuestos utilizados debido a sus propiedades fisicoquímicas. La fotocatalisis del TiO_2 , ocurre dentro del rango de luz UV que, al doparlo con metales como plata o cationes como hierro disminuye su ancho de banda prohibida. Lo anterior conlleva a una fotocatalisis heterogénea bajo luz visible. Debido al aumento en las aplicaciones del TiO_2 -NPs y al dopaje de este, es de suma importancia realizar estudios toxicológicos evaluando la influencia de los iones que se pueden lixiviar en solución, en el carácter tóxico del nano-material. Varias investigaciones *in vivo* han demostrado que tras la administración de TiO_2 a través de diferentes vías, éste puede ser acumulado en diferentes órganos mostrando una mayor concentración en hígado produciendo respuesta inflamatoria, aumento en la actividad enzimática, daño mitocondrial expresión de citocinas, aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y daño al ADN.

Se evaluó la toxicidad de TiO_2 , TiO_2 -Ag y TiO_2 - Fe^{+3} a través de pruebas *in vivo* e *in vitro*. Los análisis por SEM, TEM, EDX, XRD mostraron NPs esféricas de ~10nm, radio hidrodinámico ~700 nm, baja estabilidad en SSF (sólo TiO_2 Sigma-Aldrich, TiO_2 - Fe^{+3} 3% y TiO_2 -Ag 0.5% fueron estables en SSF), carga positiva y disminución de la cristalinidad conforme se aumenta el dopaje de TiO_2 con Ag. *In vitro* las NPs de TiO_2 sintetizado por nuestro grupo de investigación presentaron menor actividad hemolítica que TiO_2 comercial (eritrocitos lavados); TiO_2 y TiO_2 - Fe^{+3} no causaron hemólisis en sangre completa al contrario que los NMs de TiO_2 -Ag los cuales causaron actividad hemolítica a bajas concentraciones presentando lixiviación de iones en solución. *In vivo*, los NMs produjeron daño temprano al hígado, cambios morfológicos asociados a respuesta de lesión reversible y activación de la respuesta inmune sistémica. Los resultados sugieren que la toxicidad de NPs de TiO_2 y TiO_2 dopadas está determinada por sus propiedades fisicoquímicas y la disolución de los iones Ag^+ en solución. Así también una exposición crónica puede llevar al daño irreversible en hígado y a una baja regulación de la respuesta inflamatoria la cual juega un papel crucial en la defensa del organismo y su baja regulación puede aumentar el daño al hígado y otros órganos.

ABSTRACT

Engineered nanomaterials (NMs) are defined as having one or more dimensions in the 1–100 nm range. TiO_2 has been widely used in many applications because of its strong oxidizing capabilities, chemical stability, long durability, non-toxicity and low cost. The photocatalytic properties of TiO_2 occurs upon the absorption of ultraviolet (UV) light, because of this, the doping of TiO_2 with noble metals such as silver and cations such as iron, have showed to effectively decrease TiO_2 band gap making the heterogeneous photocatalytic activity of TiO_2 under visible light. Evaluation of the toxicity of TiO_2 is a fundamental task relating to its extremely small size, high surface area and increased surface reactivity as compared to larger materials. In the same way, the doping with silver or iron would increase the risk of TiO_2 due their properties as well the dissolution of ions. *In vivo* studies have been shown that TiO_2 can be accumulated in the liver, kidney, spleen, lung, heart and brain showing a highest concentration in the liver generating various inflammatory responses, promote enzymatic activities, damage to mitochondria, the mRNA expression of cytokines during proinflammatory responses produce reactive oxygen species and, cause DNA cleavage in cells.

The objective of this research was to assess *in vitro* e *in vivo* toxicity of TiO_2 and TiO_2 doped with silver ($\text{TiO}_2\text{-Ag}$) and trivalent iron ($\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$) at different percentages (Ti/Mmol%). To elucidate the structure of NMs, microscopic and spectroscopic characterization techniques were applied. Results showed spherical particles with average particle size of about 10 nm (SEM), crystalline phase of anatase, which decreases as the doping of silver increases (XRS). The zeta potential exhibited an absolute positive charge and particle agglomeration. TiO_2 Sigma-Aldrich, $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 3% and $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 0.5% showed stability in SSF. *In vitro* studies showed that commercial TiO_2 induce higher hemolytic activity in red blood cells that the TiO_2 synthesized by our research group. In contrast, using whole blood TiO_2 caused no hemolytic activity as well $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$. With respect to $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ NMs no difference was observed in the hemolytic activity using red blood cells or whole blood. The atomic absorption spectroscopy analysis indicated no presence of Iron ions in solution, whereas Ag ions were found. *In vivo* acute and sub-acute toxicity of NMs were investigated through biochemical, immunological and histopathological analysis. The results from acute studies showed histopathological changes and hepatocytes necrosis of mice liver mainly in mice under treatment with $\text{TiO}_2\text{-Ag}$. In contrast the results of the sub-acute analysis showed no difference with respect to the control until day 56 of treatment in the groups treated with TiO_2 or $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$. Our results showed that the toxicity of TiO_2 depend of its physicochemical properties, the metal doping the titania, and the release of ions from the NMs. Our results also implied that the inflammatory responses induced by TiO_2 and $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ may be involved in liver toxicity.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha tenido un incremento significativo en las investigaciones de una de las ciencias con mayor crecimiento, la “Nano-tecnología”, que estudia, diseña, crea, sintetiza, manipula y aplica materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nano-escala, se basa en partículas de tamaño nanométrico, nano-partículas (NPs), utilizadas como materia prima, las cuales tienen un tamaño menor de 100 nm en al menos una de sus tres dimensiones. Ésta ciencia está en rápido desarrollo con más de 1000 nano-productos en el mercado (Peralta, 2012) cómo agentes de administración de drogas, agentes de contraste en imagenología, catalíticos, filtración de agua, semiconductores, cosméticos, micro-electrónicos, textiles, bio-sensores, agentes de remediación ambiental, entre otros, estando en contacto directo o indirecto con el hombre.

La nanotecnología es una ciencia que ha innovado la tecnología brindando grandes beneficios a la sociedad, sin embargo esta nueva tecnología pudiera estar rodeada de posibles riesgos para el ambiente y la salud humana. En la actualidad las investigaciones científicas no solo se han enfocado en las aplicaciones de los nano-materiales (NMs), sino también en análisis nano-toxicológicos para poder prevenir los efectos adversos que pudieran ocurrir de una manera temprana y crónica, ampliando así los conocimientos sobre los riesgos de las nano-partículas y su interacción con el medio ambiente y los seres vivos. Por lo que una de las preguntas principales de la nano-toxicología es ¿Qué tan segura es la nanotecnología? Para poder contestar ésta pregunta se deben realizar análisis de riesgos considerando varios factores para entender su impacto en la salud humana como son: la exposición, el potencial del material para causar daño, la cantidad de material capaz de llegar a un órgano determinado dentro del cuerpo, la interacción con las células, tiempo de distribución y eliminación. Así mismo, no sólo es importante determinar el efecto de las nano-partículas en la salud humana, sino también los mecanismos que están involucrados en la entrada y acción toxicológica de estos materiales en los seres vivos (Barbara et al, 2006).

I.1. ORIGEN DE LAS NANO-PARTÍCULAS

La presencia de nano-partículas en la naturaleza se debe a que éstas pueden ser producidas de manera natural (procesos naturales), debido a la actividad antropogénica (generalmente asociadas a contaminación) y de manera sistemática, buscando principalmente, aplicaciones industriales (Figura1). De manera natural son generadas por procesos biológicos y geológicos en cenizas volcánicas, aguas naturales, suelo, glaciales y cráteres. En el caso de las fuentes antropogénicas, las nano-partículas pueden ser generadas accidentalmente como producto de las actividades humanas (contaminación urbana, desgaste de los neumáticos, etc.); y también, pueden ser generadas intencional y ordenadamente, buscando aplicaciones específicas de las mismas. Ambas fuentes representan un riesgo tóxico para el hombre y su entorno (Handy et al, 2008). Una de las principales vías de exposición a NPs, es a partir de la fabricación de estas, donde los trabajadores son los que están potencialmente expuestos a las NPs. Schulte y colaboradores (2013) mencionan cinco criterios importantes para el desarrollo responsable de nano-partículas: 1) anticipar, identificar y realizar un seguimiento de los nano-materiales potencialmente peligrosos en el lugar de trabajo, 2) evaluar la exposición de los trabajadores a los nano-materiales; 3) evaluar y comunicar los peligros y los riesgos para los trabajadores; 4) gestionar los riesgos de seguridad y salud ocupacional y 5) fomentar el desarrollo seguro de la nanotecnología y la realización de su beneficio social y comercial.

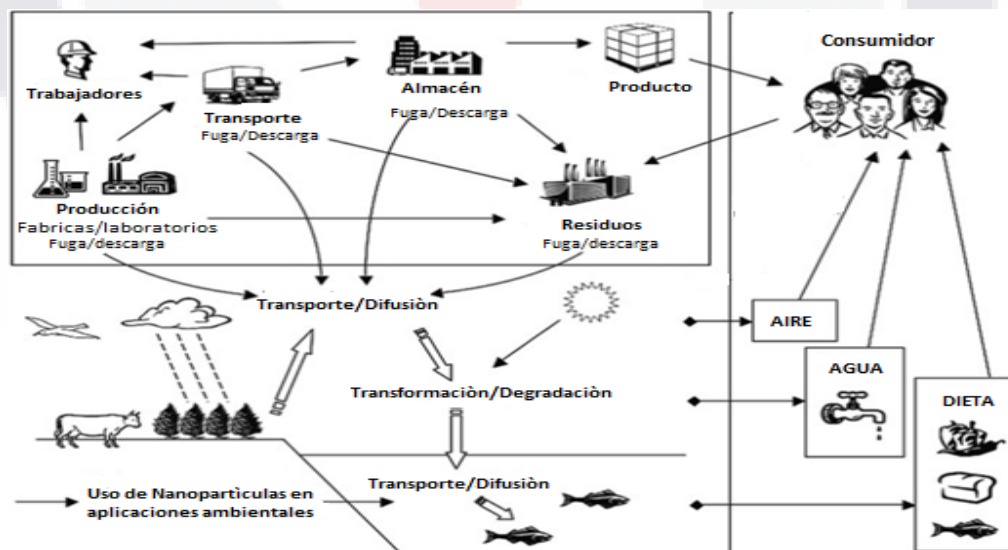


Figura 1: Posibles rutas de exposición a nano-partículas. ("Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties", Nanoscience and Nanotechnologies, July 2004. Copyright the Royal Society 2004)

Se ha demostrado que los NMs poseen propiedades únicas, las cuáles pueden ser moduladas en función de su tamaño, mejorando en la mayoría de los casos su rendimiento en comparación con los materiales a mayor escala por lo que sus aplicaciones comerciales están en un rápido crecimiento, encontrándolas así cada día más en el ambiente debido al incremento significativo en su producción (Sushma et al, 2013). Sin embargo estas mismas propiedades pueden representar del mismo modo un riesgo para la salud y el medio ambiente.

I.2. NANO-CIENCIA

La nano-ciencia, es una ciencia interdisciplinaria que combina la química, biología, ingeniería y medicina; para poder entender química y físicamente la interacción de las nano-partículas con el organismo tanto de una manera positiva (aplicaciones biomédicas) como negativa (daño al organismo). El comprender la influencia de las NPs sobre la función celular e interacciones biológicas puede conducir al desarrollo de nuevas técnicas de detección, diagnóstico, tratamiento y mejora de las técnicas de terapia génica así como la detección de agentes biológicos.

I.3. NANO-TECNOLOGÍA

La nano-tecnología es el estudio, creación y aplicación de materiales extremadamente pequeños, a partir de la manipulación de la materia a una escala nano-métrica (Figura 2). La nano-tecnología involucra a diferentes áreas de la ciencia, ingeniería y tecnología. Aunque la nanotecnología es relativamente nueva, los nano-materiales se han usado durante siglos sin ser conscientes de ello. Nano-partículas de oro y plata son las responsables de los colores de los vitrales de las iglesias medievales los cuales han perdurado cientos de años. En la actualidad, los científicos y los ingenieros han desarrollado diferentes formas para sintetizar deliberadamente materiales a nano-escala para aprovechar sus propiedades, tales como mayor resistencia y control del espectro de la luz y mayor reactividad química que sus homólogos en composición a macro escala (NIH, 2013).

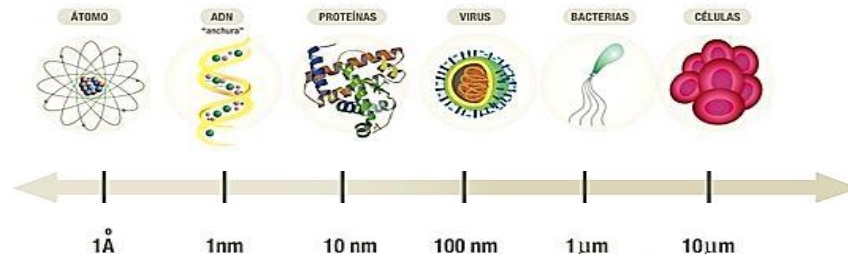


Figura 2: Escala nano-métrica. Un nanómetro es una millonésima parte de un metro (10^{-9} m). El tamaño de las Nano-partículas se sitúan entre la molécula de ADN (1-2nm) y algunos virus (~50 nm).

Las ideas y los conceptos detrás de la nano-ciencia y la nanotecnología comenzaron con una charla titulada "There's Plenty of Room at the Bottom" por el físico Richard Feynman en una reunión de la Sociedad Americana de Física en el Instituto Tecnológico de California, el 29 de diciembre de 1959. En su charla, Feynman describe un proceso en el cual los científicos serían capaces de manipular y controlar los átomos y moléculas individuales. Pero el término nano-tecnología fue acuñado por el Profesor Norio Taniguchi en 1974.

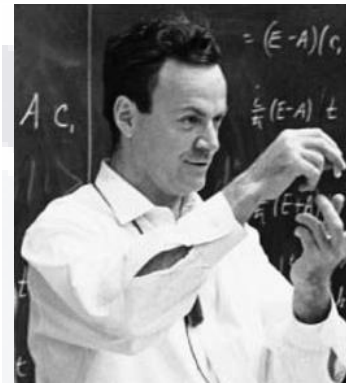


Figura 3: Richard Feynman. Físico y padre de la nano-tecnología

I.3.1. CLASIFICACIÓN DE LAS NPs

Las NPs existen en diferentes tamaños, formas y composición. De acuerdo a su composición los nano-materiales se clasifican, según La Agencia del Medio Ambiente (EPA) de Estados Unidos en (figura 4):

- I.3.1.1. Orgánicos:** compuestos en su mayoría por carbono y suelen adoptar formas como esferas huecas, elipsoides o tubos. Los electrones que participan en sus enlaces químicos se encuentran en orbitales de tipo s y p , que tienen la propiedad de formar enlaces en direcciones bien determinadas (Moran, 2012).
- I.3.1.2. Fullerenos:** estructuras esféricas de 60 Carbonos (Fuller) o 70 carbonos (C_{70}) a los cuales se les puede introducir otros átomos en su interior modificando sus propiedades (Naahidi, 2013). Los fullerenos pueden ser sujetos a altas presiones y recuperar su forma original una vez disminuida la

presión. Durante su proceso de síntesis, algunos átomos de carbonos pueden ser remplazados por otras moléculas o se pueden incorporar a su superficie química o dentro ella (nanotubos de carbono). Los fullerenos tienen diferentes aplicaciones médicas (Holister et al, 2013) principalmente como sensores de radicales libres (Krusic et al, 1991) y vectores de droga dirigida (Fiorito et al, 2007).

I.3.1.3. Nanotubos de carbono: estructuras cilíndricas huecas con simples capas de grafito enrolladas en una forma tubular que presentan una o varias capas (Peralta J, 2011). Existen dos tipos de nanotubos de carbono: de pared única (SWCNT) o de pared múltiple (MWCNT). Los primeros están constituidos por un tubo sencillo de grafeno con un diámetro entre 0.4 a 3.0 nm y una longitud de 1 μm , mientras que los MWCNT son múltiples capas de tubos apilados unos con otros resultando un diámetro de 1.4 a 100 nm (Aillon et al, 2009). Los nanotubos de carbono son química y térmicamente estables (Hameed Hyder et al, 2003), poseen una gran área superficial y a su vez poseen un alto grado de aglomeración lo que conlleva a una disminución del área superficial total y su capacidad de interacción con las diferentes células (Donaldson et al, 2006). Se han considerado algunas aplicaciones para los nanotubos de carbono como: prótesis ortopédicas, implantes, biosensores para la detección de proteínas, terapia contra el cáncer, entre otros (Fiorito et al, 2007).

I.3.1.4. Grafito: es un arreglo anisotrópico, en el cual tres de los enlaces químicos forman arreglos atómicos bidimensionales con estructura hexagonal. Sus enlaces se unen muy débilmente y es posible desplazarlas con facilidad (Moran, 2012).

I.3.1.5. Inorgánicos: partículas (metálicos u óxidos metálicos) que poseen al menos una escala de longitud en el rango nano-métrico. Su tamaño nano-métrico lo distingue del mismo compuesto o elemento a mayor escala debido a que poseen propiedades únicas como mecánicas y eléctricas que no se observan a mayor tamaño.

I.3.1.6. Óxidos metálicos: estos nano-materiales son particularmente atractivos debido a sus aplicaciones en catálisis, sensores, conversión solar, energía, óptica y electrónica. Poseen al menos una escala de longitud en el intervalo de nanómetros. Están compuestos por oxígenos unidos a uno o más metales

de transición. La acidez y basicidad relativa de los átomos presentes en la superficie de óxidos metálicos se ve afectada por la coordinación del metal y el oxígeno, que altera las propiedades catalíticas de estos compuestos. Así también pueden someterse a adsorción y desorción así como absorción de radiación electromagnética seguida de una reacción de óxido-reducción lo que lo hace útil para foto-degradación de compuestos.

I.3.1.7. Metales: los nano-materiales a base de metales han sido de gran interés, principalmente en la última década, al conjugarlos con ligandos, anticuerpos y drogas de interés en biotecnología, biomedicina, separación magnética, drogas dirigidas, diagnóstico en imagenología, entre otros.

I.3.1.8. Puntos Cuánticos: caracterizados por una estructura cristalina compuesta generalmente de un material semiconductor con propiedades ópticas y eléctricas únicas con un núcleo cristalino metaloide. En general estos son materiales semiconductores del tipo II-VI (Aillon et al, 2009).

I.3.1.9. Polímeros: incluyen polímeros sintéticos, polímeros naturales (por ejemplo, proteínas), y polímeros pseudo-sintéticos. La arquitectura del polímero, composición, estabilidad y la solubilidad en agua son factores importantes para sus diferentes aplicaciones (Naahidi, 2013)

I.3.1.10. Dendrímeros: polímeros altamente ramificados cuya forma, tamaño, longitud, densidad de ramificación y superficie se puede controlar y están bien definidas. A partir del núcleo emergen ramas poliméricas de alta especificidad, formando cavidades en toda la molécula. Estos canales y las estructuras cerradas permiten el atrapamiento físico o encapsulación de los productos farmacéuticos (Goldberg et al, 2007). Los métodos de polimerización para estos nano-materiales usualmente llevan a polímeros con estructuras químicas controladas y una baja polidispersión aunque usualmente sus longitudes de cadenas (pesos moleculares) y estructuras son diferentes en cada síntesis, lo que hace difícil definir y generalizar su comportamiento *in vivo*. Su naturaleza heterogénea representa el mayor obstáculo en el uso de estos nano-materiales poliméricos en áreas como biomédica y farmacéutica (Aillon et al, 2009). Los dendrímeros, a comparación de otros polímeros nano-estructurados poseen baja viscosidad, polidispersión y baja densidad de superficie (Kesharwani et al, 2013). Dendrímeros como: poliamidoamina, propilenoamina y triazina (Tiriveedhi et

al, 2011; Jongdoo et al, 2012) han sido ampliamente utilizados como vehículo de fármacos.

I.3.1.11. Basadas en Lípidos: Se componen generalmente de una o más bicapas de una molécula de lípidos con una conformación tal para la formación de vesículas. Un ejemplo son los liposomas, los cuales poseen forma esférica y su superficie está compuesta de los mismos componentes de una membrana celular (Naahidi, 2013).

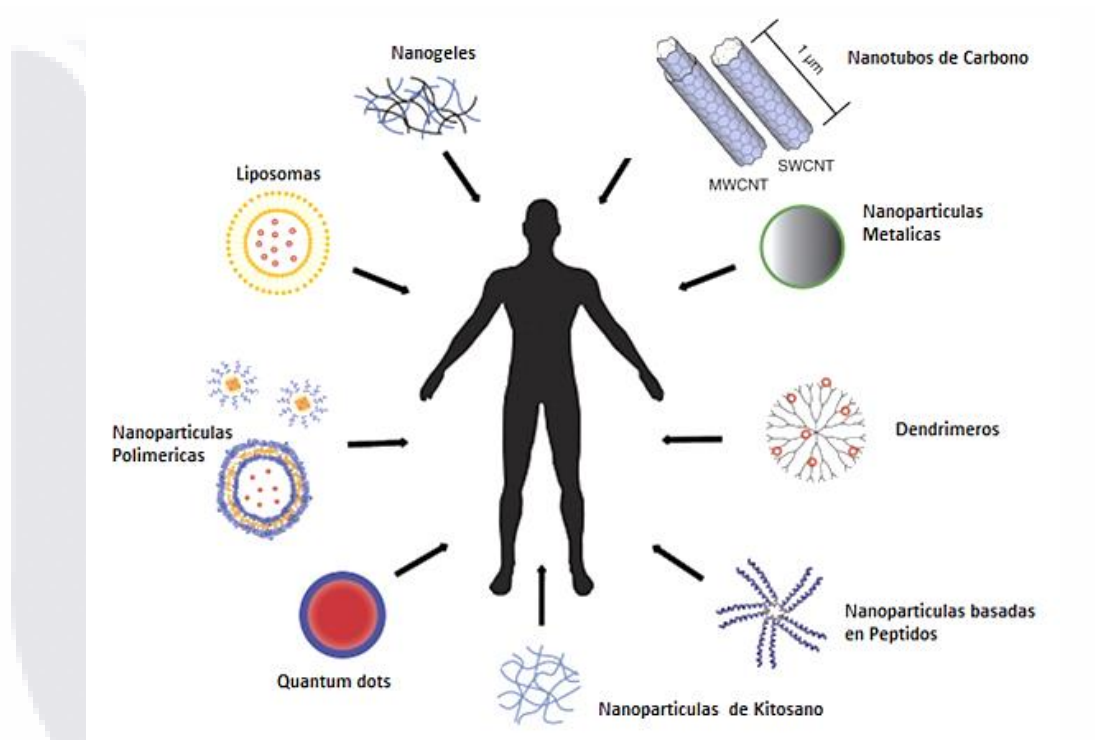


Figura 4: Clasificación de NPs a la cuáles los seres humanos están expuestos directa o indirectamente. Lehner et al, 2013 *“Intelligent nanomaterials for medicine: Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application Roman”*

I.3.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

Existen diferentes metodologías para la síntesis de las nano-partículas las cuáles permiten la manipulación controlada del tamaño y la forma de las partículas. Estos métodos se agrupan en dos categorías: de arriba hacia abajo (de sólidos másicos en porciones más pequeñas) y de abajo hacia arriba (a partir de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución).

La síntesis de nano-materiales puede ser a través de procesos químicos o físicos (como trituración o molienda), estos últimos usualmente requieren más control para

obtener un tamaño apropiado y forma (Peralta, 2011). Dentro de las rutas químicas para la fabricación de nano-materiales, se pueden enumerar:

I.3.2.1. Proceso sol-gel

A través del proceso sol-gel, se pueden obtener nano-materiales de óxidos metálicos a partir de la dispersión de partículas coloidales sólidas en una fase líquida y la eliminación del solvente. Existen dos rutas principales, dependiendo si el precursor es una sal inorgánica en solución acuosa o un sólido agregado formado por subunidades coloidales.

a) **Soluciones de precursores iónicos:** son desestabilizados por cambios en el pH o en la temperatura de la solución, iniciando el proceso de hidrólisis seguido por el de condensación.

b) **Sólido agregado formado por subunidades coloidales:** se inicia con agregados de partículas coloidales en un solvente, la cual es peptizada por la adición de algún electrolito u otro solvente.

Las reacciones de hidrólisis y condensación ocurren simultáneamente mientras que las condiciones a las cuales se lleva la reacción de gelación son determinantes en la estructura y textura de las nano-partículas (producto final). Las condiciones de pH son fundamentales ya que a condiciones ácidas, las partículas en sol y en el gel son muy uniformes variando en su tamaño entre 0.5 y 3.0 nm proporcionando una alta porosidad al material. En condiciones básicas el material tiende a ser menos poroso. Este método es el más utilizado para la síntesis de nano-partículas debido a sus amplias ventajas como la alta homogeneidad, pureza, control total en el tamaño, áreas superficiales altas, tamaño de poro regulado, mayor estabilidad térmica, facilidad en la adición de elementos en la red de los nano-materiales, así como la minimización de la degradación térmica. Por otro lado es difícil controlar la cinética de crecimiento de los cristales cuando se preparan grandes cantidades de NMs pudiendo conducir a la aglomeración de las nano-partículas (Brinker et al, 1990). Este método de síntesis es uno de los más utilizados debido a las características ya mencionadas, donde se han sintetizado diferentes nano-partículas como: Ag-NPs (Medina et al, 2009), Silica-NPs (Bengt et al, 2010), quitosano (Wen et al, 2012)

I.3.2.2. Método coloidal

Los coloides son partículas individuales, que exhiben movimiento browniano por lo que su movimiento irregular en suspensión y el rango de tamaño de partículas en una solución coloidal suele oscilar en el rango de nanómetros. Este método consiste en disolver una sal del precursor metálico o del óxido a preparar, un agente reductor y un estabilizante en una fase continua o dispersante. El tamaño promedio, la distribución de tamaños y la forma de las nano-partículas pueden ser controlados variando la concentración de los reactantes, del reductor y del estabilizante. Con este método se puede controlar el tamaño, forma y morfología de las nano-partículas variando la concentración de los reactantes, del reductor y del estabilizante; se pueden formar dispersiones estables por periodos de tiempo muy largos además de ser un método estable y reproducible para la preparación de coloides metálicos aunque la mayoría de las veces hay incremento del tamaño de las partículas cuando es necesario remover el estabilizante por medio de un tratamiento térmico (Zanella et al, 2012). Las NPs inorgánicas y magnéticas son un ejemplo de nano-partículas sintetizadas por este método (Poornima et al, 2013).

I.3.2.3. Reducción fotoquímica y radioquímica

La síntesis de nano-partículas metálicas se realiza modificando el sistema químico por medio de altas energías generando reductores fuertes altamente activos como electrones, radicales y especies excitadas. La síntesis de nano-partículas metálicas por reducción fotoquímica (fotólisis) y la radioquímica, tienen la ventaja de producir nano-partículas de alta pureza, ya que no se forman impurezas por el uso de reductores químicos, permiten la síntesis bajo condiciones de estado sólido y a bajas temperaturas. La desventaja de este método es que su eficacia es sensible a las características del precursor (Zanella et al, 2012).

I.3.2.4. Irradiación con microondas

La técnica de irradiación con microondas produce nano-partículas con una muy baja dispersión de tamaño, pero no un control preciso en la morfología, las microondas actúan como campos eléctricos de alta frecuencia, capaces de calentar cualquier material con cargas eléctricas. Los solventes polares se calientan y sus componentes moleculares se ven obligados a girar con el campo y pierden energía en colisiones. Las muestras conductoras y semiconductoras se calientan cuando los iones y los

electrones contenidos en ellas forman una corriente eléctrica y la energía se pierde debido a la resistencia eléctrica del material. Este es un método rápido, uniforme y efectivo (Zanella et al, 2012). Diferentes nano-partículas se han logrado sintetizar bajo este método: $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (Deliang et al, 2013), Ag- carboximetil quitosano (Ying et al, 2012), Fe_2O_3 (Poornima et al, 2013).

I.4. NANO-TOXICOLOGÍA

La nano-toxicología, parte fundamental de la nano-ciencia, se va a encargar de estudiar y entender los determinantes fisicoquímicos, rutas de exposición, bio-distribución, determinantes moleculares, genotoxicidad y aspectos de regulación de nano-partículas. Varios estudios han mostrado los efectos y mecanismo de acción de compuestos químicos de escalas micro y macrométrica sobre las células, pero poco se sabe sobre la interacción de los nano-materiales y las células y/o biomoléculas. La evaluación de la citotoxicidad es de crucial importancia debido a la demanda de crecimiento de nano-partículas con el desarrollo de nuevas aplicaciones biológicas.

El uso de los nano-materiales es algo nuevo y aunque se ha desarrollado rápidamente se necesita un mayor conocimiento de la interacción del nano-material y las células ya que, directa o indirectamente el ser humano está en contacto con ellos. Los efectos biológicos están atribuidos a las propiedades fisicoquímicas como: tamaño, superficie, distribución, composición química, propiedades eléctricas, estructura de superficie (reactividad de superficie, grupos, composición orgánica o inorgánica), forma, agregación y solubilidad. Se ha observado que nano-partículas de óxidos que presentan mayor solubilidad en agua, por ejemplo ZnO , muestran una mayor toxicidad en células de mamíferos comparadas con las que presentan una menor solubilidad (Auffan et al, 2009).

Los estudios toxicológicos deben realizarse tanto con pruebas *in vitro* como *in vivo* relacionando estos resultados con las propiedades fisicoquímicas de cada material, ya que el mismo material a diferente tamaño nano-métrico y forma, tendrá diferentes respuestas. Es importante señalar que tanto las propiedades como los efectos serán totalmente diferentes al utilizar materiales macro-métricos que nano-métricos. Por ello la importancia de estudios aislados de cada nano-partícula y la relación con los resultados con diferentes pruebas toxicológicas.

I.4.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

A pesar de los diversos estudios toxicológicos de las NPs que se han realizado en los últimos años, estos han arrojado resultados difíciles de interpretar y algunas veces contradictorios. Para entender de una mejor manera su comportamiento toxicológico, es necesario realizar una correcta caracterización física y química. Las propiedades fisicoquímicas únicas de los NMs han sido atribuidas a su tamaño pequeño (área superficial, distribución de tamaño), composición química (pureza, cristalización, propiedades electrónica), estructura superficial (reactividad superficial, grupos de superficie, recubrimientos orgánicos o inorgánicos), solubilidad, forma y agregación. En realidad, las mismas propiedades que conducen a los avances en la nano-tecnología, también conduce a procesos biológicos únicos, los cuales deben de ser ampliamente estudiados (Nel 2006 et al; Lee et al, 2010).

La principal característica de los NMs es su tamaño, por el cual pueden caer en una zona de transición entre átomos individuales o moléculas. La disminución de tamaño lleva a un aumento del área superficial con respecto al volumen (Wang et al, 2007) lo que determina el número potencial de grupos reactivos en la superficie de la partícula; en una partícula cuyo tamaño es de 30 nm, cerca del 10% de las moléculas se encuentran en la superficie, mientras que una partícula de 10 y 3 nm incrementa 20% y 50% respectivamente. El número de átomos o moléculas en la superficie de la partícula puede determinar la reactividad del material (Nel et al, 2006; Kreyling et al, 2006; Rejman et al, 2004). Debido a lo anterior, las nano-partículas de menor tamaño pueden entrar fácilmente a través de las membranas biológicas modificando el ambiente interno de la célula (Buzzea et al, 2007). Barbara Rother y col (2006) demostraron que TiO_2 -NP causan mayor inflamación y toxicidad que partículas finas de TiO_2 .

La alta área superficial y la disposición de los átomos en la estructura determinan la unión, absorción y transporte de las NPs con otros compuestos en las células o tejidos (Peralta, 2011), así como un aumento en la actividad inflamatoria, pro-oxidante y antioxidante. Monteiller y colaboradores (2007) mostraron que el área superficial es un factor determinante en la producción de efectos inflamatorios en células epiteliales *in vitro*, aumentando el área de contacto entre estos y el ambiente biológico (Abe et al, 2009).

La composición química de la superficie, la estructura cristalina y las propiedades de las NPs pueden definir las interacciones químicas con los diferentes compuestos celulares (Powers et al, 2006). El TiO_2 tiene tres fases cristalinas diferentes (anatasa, rutilo y brookita) las cuales se ha demostrado que presentan diferente actividad fotocatalítica, siendo la forma anatasa la fase que muestra una mayor actividad (Bengt et al, 2010).

La aglomeración, sedimentación y difusión de las NPs, depende fuertemente de la carga y superficie química de las NPs, siendo posible que cualquier cambio en pH o fuerza iónica pueda causar una diferencia en la toxicidad del TiO_2 , lo cual explicaría muchos resultados diferentes en diversas investigaciones acerca de la toxicidad de NPs de TiO_2 , pero hasta ahora la agregación de estas nano-partículas no se ha considerado ampliamente (Baan et al, 2006).

Los grupos superficiales pueden hacer a la NP hidrofóbica o hidrofílica, o catalíticamente activa o pasiva. Estas propiedades de la superficie pueden llevar a la toxicidad de diferentes maneras. Una de ellas es a través de la activación física o química: por la interacción con los sitios activos (donando o aceptando electrones). Los electrones aceptados pueden llevar a la formación de radical superóxido (O_2^-) al reaccionar con el oxígeno (O_2), el cual puede, a través de la reacción de Fenton, generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ze, Yuguan, 2013).

Otra propiedad fisicoquímica importante es el potencial electrostático entre la capa estacionaria del fluido que rodea las NPs y el fluido en su entorno, el cual, ha demostrado ser crítico en la modulación de los efectos citotóxicos de las nanopartículas (Sayes et al, 2010). Mura y colaboradores (2011) propusieron que la citotoxicidad de las NPs pudiera ser modulada controlando la interacción electrostática entre las NPs y la célula blanco. Por otro lado la naturaleza de la capa superficial de los NMs que se puedan encontrar en el organismo puede influenciar la captación celular y ser modificados por el ambiente biológico a través de la absorción de proteínas y otras biomoléculas (Monopoli et al, 2011). Por lo tanto, las propiedades fisicoquímicas pueden modificar la entrada y salida celular, unión a proteínas, translocación del sitio de entrada al órgano blanco así como la posibilidad de ocasionar daño a las células y tejidos.

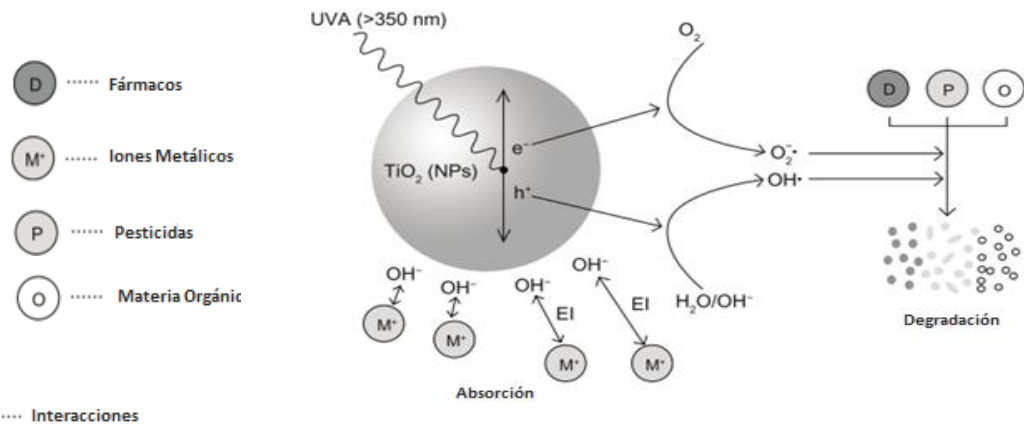
I.4.2. NANO-PARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO (TiO₂)

El Dióxido de titanio (TiO₂) es un compuesto poco soluble, inerte, abundante y que ha sido considerado como un compuesto no tóxico y ambientalmente benigno. Debido a sus propiedades, como el alto índice de refracción y su actividad fotocatalítica, ha sido ampliamente utilizado en la industria y en aplicaciones médicas como antivirales (TiO₂ recubierto con placa de cerámica) (Zan L. et al, 2007), tratamiento de células cancerígenas (nano-tubos de TiO₂) (Kalbacoba et al, 2008), regeneración de tejido óseo (hidroxipatita- TiO₂ NPs) (Kim et al, 2010), agentes de protección solar en cosméticos (TiO₂ recubierto con mica de plaquetas) y como agente antibacterial (complejo TiO₂-Ag-quitosano) (Kim et al, 2004), entre otros.

I.4.2.1. FOTOCATALISIS DEL TiO₂

Varias investigaciones se han enfocado en el uso y aplicaciones del TiO₂ debido a que 1) puede absorber o dispersar la radiación UV y 2) es un semiconductor fotocatalítico activado bajo radiación UV (Fujishima et al, 2000). Debido a esta última característica varias investigaciones se han enfocado a la foto-catálisis del TiO₂ para la degradación de la materia orgánica contaminante.

El proceso de foto-catálisis de TiO₂ (Figura 5) se da al incidir luz ultravioleta la cual excita el TiO₂ generándose pares electrón hueco, los cuáles reaccionan con el agua y el oxígeno produciendo radicales libres, hidroxilo (OH°) y superóxido (O₂°). Los radicales formados producen la oxidación de los contaminantes presentes hasta formar CO₂ (dióxido de carbono) y H₂O (agua). Algunos estudios realizados han demostrado que una manera de modificar el ancho de banda prohibida de este material es mediante el dopaje con metales de transición. Como resultado del dopaje, estos materiales muestran actividad foto-catalítica al ser radiados con luz visible, lo que puede dar lugar a la implementación de procesos sustentables, ya que se puede lograr la degradación microbiana y de compuestos químicos no biodegradables al utilizar dióxido de titanio como catalizador y luz solar para activar la reacción.



EI Interacciones

Electrostaticas

Figura 5: Degradación y Absorción de TiO₂-NPs tras la irradiación de luz UV. Liu et al, 2013 “*Toxic effects of the interaction of titanium dioxide nanoparticles with chemicals or physical factors*”

Los efectos adversos de los NMs de TiO₂ no han sido elucidados sin embargo, diferentes estudios sugieren que la interacción de TiO₂-NP con otros factores físicos o químicos puede resultar en el incremento de la toxicidad (Zhao et al, 2011), poniendo en duda la baja toxicidad de este nano-material. Las nano-partículas de TiO₂ han mostrado un mayor efecto adverso bajo luz UVA a una radiación electromagnética de 315 a 400 nm (Lui et al, 2013). La foto-reactividad del TiO₂ es una propiedad importante en su evaluación toxicológica, dónde la forma cristalina anatasa es considerada como la más foto-reactiva (Sanders et al, 2012). Sin embargo algunos reportes han demostrado que una mezcla de anatasa/rutilo es más foto-reactiva que partículas de anatasa pura (Coleman et al, 2005). Se ha encontrado que la acción foto-catalítica, los efectos biológicos y la toxicidad del TiO₂ son dependientes uno de otro (Auffan et al, 2009), por lo tanto las mismas propiedades que hacen al TiO₂ un agente foto-catalítico pueden conducir a reacciones de foto-toxicidad en humanos. La absorción de radiación UVA (340-400 nm), activa a los electrones de superficie de la molécula de TiO₂ de la banda de conducción, dejando un hueco a la banda de valencia que toma electrones del agua o iones OH, generando radicales hidroxilo. Estos radicales hidroxilo reducen al O₂ produciendo anión superóxido, el cual lleva a la cascada de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por lo tanto, la radiación UVA puede inducir la producción de ROS (Sanders et al, 2012).

La absorción y distribución del TiO₂-NP aun no es muy clara, pero existen varias investigaciones referentes a la interacción de este material y tejido alveolar; donde se ha observado que la eliminación de las partículas finas (<100 nm) de los pulmones es más rápida que partículas ultrafinas (<10 nm), incrementando así el tiempo de exposición y el potencial riesgo para las células (Abe S, 2009). Así también, los nanomateriales pueden ser capaces de evadir la eliminación a través de procesos de fagocitosis (proceso de endocitosis a través de la ingestión celular de partículas) y eliminación por Reticulo Endoplásmico (Elder et al, 2007), planteando así la posibilidad de la acumulación del TiO₂ y su retención en las células tras una larga exposición y baja concentración de exposiciones ambientales (Sanders et al, 2012).

La determinación de iones tras su lixiviación (disolución) de las nanopartículas metálicas es un factor determinante para la toxicidad de los nanomateriales. La disolución es un proceso dinámico por el cual las partículas pasan a la fase de solución formando una mezcla homogénea. Durante la disolución de iones, moléculas constituyentes de la disolución de sólidos migran desde la superficie de la solución a través de una capa de difusión entre la superficie de la partícula y su medio. (Borm et al, 2006). La fuerza impulsora para la disolución depende de la solubilidad del metal dentro de un entorno determinado, así como el gradiente entre la superficie de la partícula y las propiedades fisicoquímicas de la solución (Auffan et al, 2009), como fuerza iónica y pH, así como las propiedades de la partícula como los cambios dependientes del tamaño de la curvatura de la superficie y la rugosidad de las partículas pueden aumentar la disolución (Borm et al, 2006). Debido a lo anterior, la disolución de los iones de NPs *in vivo* debe ser considerado como un factor importante en la interpretación de las respuestas biológicas a la exposición a nanopartículas.

La foto-disociación se da a través de los huecos generados en la banda de valencia tras la irradiación de Luz UV al TiO₂. Una vez generado este hueco, puede producirse una reacción de óxido reducción en la cual el metal que está dopando al TiO₂ dona el electrón de la banda de valencia quedando con carga positiva (h⁺), generándose la disociación, pudiendo reaccionar con los radicales formados por los electrones de la banda de conducción o con moléculas del medio. Aihua Sun y colaboradores (2005) observaron que la foto-disociación es dependiente de la cristalinidad del compuesto semiconductor.

I.4.2.2. VIAS DE EXPOSICION A TiO₂- NPs

Tres principales rutas de entrada de NPs al organismo son a las que se les ha dado una mayor importancia: inhalación, ingestión y penetración dérmica. Hoy en día dos nuevas rutas son estudiadas debido a la implementación médica de nanomateriales: inyección y liberación de NPs a partir de implantes (Zhao et al, 2011). No sólo es de importancia el conocer los efectos en la salud humana, sino también conocer los mecanismos involucrados en 1) la penetración de las NPs en el organismo a través de las películas tenso activas, el sistema mucociliar, células fagocíticas y las estrechas uniones epiteliales 2) interacciones con los diferentes compartimentos celulares 3) absorción, 4) distribución. 5) interacciones con los compuestos de la sangre, 6) Interacción con las diferentes líneas celulares, 7) acumulación y/o 8) eliminación de las nano-partículas (Barbara R., 2006)

I.4.2.3. VIA RESPIRATORIA

Diferentes estudios en el tracto respiratorio se han llevado a cabo para elucidar la toxico-cinética de las nano-partículas ya que es una de las principales vías de exposición y medio de entrada de diferentes partículas al organismo. Los pulmones contienen un extenso mecanismo de defensa y eliminación como el sistema mucociliar en las vías superiores y los macrófagos en las vías inferiores (Borm et al, 2006). Las nano-partículas pueden entrar en contacto con el epitelio de las vías respiratorias y los macrófagos producto del proceso de desplazamiento en los pulmones. No todas las partículas que se encuentran en el sistema respiratorio son fagocitadas por los macrófagos; muchas de las partículas son capaces de cruzar la barrera alvéolo-capilar y pasar al sistema circulatorio (Barbara et al, 2006). Una vez en el organismo estas partículas pudieran acumularse en diferentes áreas del sistema respiratorio lo cual dependerá principalmente del tamaño, diámetro y densidad. La inhalación de nano-partículas en las células del epitelio respiratorio puede conducir a un deterioro en el aclaramiento pulmonar (acumulación) y/o distribución a diferentes órganos, respuesta inflamatoria, producción de especies reactivas de oxígeno, lesión y proliferación celular, fibrosis, inducción de mutaciones y por último cáncer (Bjattacharya et al, 2009). Estos mecanismos se han observado en personas que trabajan en ambientes con mucho polvo, como es el caso de los mineros aunque exposiciones a TiO₂ se da

en su mayoría durante el embalaje, fresado, limpieza y mantenimiento en las industrias. En tejido pulmonar $\text{TiO}_2\text{-NP}$ tiene un alta tasa de retención debido a las interacciones de Van der Waals (Pietropaoli et al, 2004). La IARC (International Agency for Research on Cancer) ha clasificado al $\text{TiO}_2\text{-NP}$ como posible carcinógeno humano (Grupo 2B) debido a la suficiente evidencia experimental (principalmente en pulmones) en animales e inadecuada evidencia en humanos (IARC, 2006). A pesar de esta clasificación, Jiangxue y colaboradores (2007) observaron que $\text{TiO}_2\text{-NP}$ de 25 y 80 nm no generaban cáncer ni síntomas en ratones tras exposiciones agudas de una dosis única de 5g/Kg de peso.

I.4.2.4. VIA ORAL

Una de las rutas potenciales del $\text{TiO}_2\text{-NP}$ es la ingestión oral debido a que es utilizado como aditivo de alimentos, en pastas dentales, cápsulas, etc. y la cantidad de éste material no debe exceder del 1% del peso del alimento de acuerdo a la regulación federal del gobierno de los Estados Unidos. Jiangxue y colaboradores (2007) mostraron en sus experimentos de biodistribución del $\text{TiO}_2\text{-NP}$, que este NMs es retenido en los tejidos del hígado, riñón, bazo, y pulmón, lo cual indica que las TiO_2 NPs pueden ser transportadas a diferentes tejidos tras una exposición gastrointestinal. A pesar que estudios sobre la toxico-cinética del TiO_2 no es clara, el hígado, riñones, bazo y pulmones son probablemente los mayores órganos blancos del TiO_2 mientras que en cerebro, plasma y células sanguíneas no se han detectado niveles de TiO_2 . Sin embargo en investigaciones recientes, se ha observado la presencia de estas nanopartículas en cerebro en pruebas agudas con dosis repetidas de TiO_2 de 5 nm (Ma L, 2010).

El tracto gastrointestinal es una ruta importante debido al uso de materiales nanoestructurados en agua, alimentos y fármacos, aunque en la actualidad existen muy pocos estudios toxicológicos referentes a ésta vía comparados con la vía inhalatoria y exposición dérmica.

I.4.2.5. VÍA DÉRMICA

La piel es el órgano primario de defensa más grande del cuerpo. Los folículos pilosos de la piel se encuentran rodeados por una densa red de capilares, los cuales facilitan la entrada dérmica de fármacos, pero al mismo tiempo son una posible vía de entrada y almacenamiento de NPs. Esta ruta de exposición es una de las principales rutas de entrada de las NPs debido a la presencia de éstas en cosméticos y bloqueadores solares. Un ejemplo de esto es el TiO_2 y ZnO , utilizados como bloqueadores eficientes de la luz UV, y liposomas los cuales son utilizados como vehículos en diferentes productos para el cuidado de la piel. El riesgo de estos NMs que están en contacto con la piel, depende en gran manera de la habilidad de estos para penetrar a través de las diferentes capas de la piel hasta llegar a la circulación sanguínea donde pueden ser distribuidas (Barbara et al, 2006).

I.4.3. PRUEBAS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Debido al rápido crecimiento en la producción de nano-materiales (NMs) es necesario la implementación de pruebas rápidas que replacen o reduzcan la experimentación con animales las cuales son lentas, costosas y éticamente controversiales y así se pueda tener una mejora, rapidez y seguridad en el desarrollo y comercialización de los nano-productos (Xianglu Hana 2012). Los efectos biológicos *in vivo* son los más caros y difíciles de obtener por experimentación, por lo que la combinación de pruebas *in vitro* y la descripción de las propiedades fisicoquímicas de los materiales pueden ser utilizados para elucidar los modelos de actividad *in vivo* de estos NMs (Lee et al, 2010). Una desventaja de las pruebas *in vitro* es que emplea altas concentraciones en un periodo corto de tiempo, mientras que en estudios *in vivo*, los animales son expuestos a bajas dosis por periodos más prolongados de tiempo (Xianglu, 2012).

Diferentes vías biológicas y mecanismos específicos pueden ser dilucidados en condiciones controladas *in vitro*, los cuales, junto con los estudios *in vivo* revelarían un enlace del mecanismo de la lesión con el resultado fisiopatológico en el órgano diana (Sumit et al, 2009). Es complicado encontrar criterios consistentes para correlacionar resultados *in vivo* e *in vitro*, es decir es crítico traducir las respuestas que se observan *in vitro* con las que equivaldrían en dosis y respuesta en estudios *in vivo*. Las pruebas

de citotoxicidad *in vitro* son pruebas de biocompatibilidad para una variedad de materiales utilizados en el área biomédica. En general, los materiales que no presentan toxicidad *in vitro* no serán tóxicos en pruebas *in vivo* (Muzquiz, 2013). Se ha encontrado en estudios *in vitro* que la alta área de superficie de las NPs puede producir una adsorción de los nutrientes esenciales en los medios de cultivos celulares haciendo difícil su interpretación toxicológica (Guo 2008). Sin embargo Xianglu y col (2012) encontraron una correlación dosis-respuesta en estudios simultáneos *in vitro* e *in vivo* basándose en el área superficial de las NPs.

Las principales ventajas que se presentan al utilizar las pruebas *in vitro* son: 1) revelan los efectos primarios hacia la célula blanco en ausencia de efectos secundarios causados por la inflamación, 2) identificación de mecanismos primarios de toxicidad en la ausencia de factores fisiológicos y compensatorios que puedan confundir la interpretación de los estudios completos en animales; 3) eficiencia, rapidez y bajos costos y 4) provee información para la mejora de estudios *in vivo*.

I.4.3.1. PRUEBA DE HEMÓLISIS

Hasta ahora poco se conoce acerca de la interacción de las nano-partículas y las diferentes células del cuerpo. Su entrada y transporte es a través del torrente sanguíneo hacia otros órganos (Barbara et al, 2006) por lo que los eritrocitos, principales componentes de la sangre, pueden entrar en contacto con las nano-partículas. La sangre es considerada el fluido que conecta órganos y tejidos y transporta sustancias que entran a nuestro organismo, por lo que la influencia de las NPs en las células sanguíneas puede proporcionar información relevante. Las alteraciones de las células sanguíneas se pueden apreciar con una deformación, aglutinación o daño membranal. La hemólisis puede producir anemia, ictericia y otros problemas. La prueba de hemólisis *in vitro* es para evaluar la biocompatibilidad de las NPs dependiendo de sus características fisicoquímicas; tamaño, porosidad y superficie en glóbulos rojos, evaluada por la cantidad de hemoglobina liberada (Yu et al, 2011). Los eritrocitos son células que no poseen receptores fagocíticos en su superficie por lo que son ideales como un modelo celular no fagocítico y estudiar como las NPs penetran a la membrana celular. Barbara Rothen y col (2006) encontraron que el tamaño de la partícula era el que influenciaba en la entrada de estas al eritrocito, no así la carga superficial o composición del material. Otra de las propiedades de los

eritrocitos (diámetro 6-8 μm) es la habilidad de deformarse para atravesar los microcapilares (2-3 μm diámetro). Esta habilidad, dependiente de la flexibilidad de la membrana, se ha visto disminuida al incrementar la concentración de materiales mesoporosos de mayor tamaño lo que sugiere la adhesión de estos materiales a la membrana celular de eritrocito. Los resultados mostrados por Yawata y col (2011) sugiere que materiales mesoporosos de sílice de menor tamaño, pueden ser considerados para la distribución de fármacos en el organismo a través de la circulación sanguínea (Zhao et al, 2011).

Así también los eritrocitos tienen la capacidad de regenerar la vitamina C reduciendo el ácido dehidroascórbico (DHA) que se encuentra dentro de ellos y así, el ascorbato, ser distribuido a los tejidos a través del plasma sanguíneo, donde juega un importante papel como antioxidante ya que directamente elimina compuestos oxidantes (ROS) y protege y recicla la vitamina E en las lipoproteínas dentro de los eritrocitos. (May, 1998).

La actividad hemolítica es un factor importante para evaluar la biocompatibilidad de un material y la interacción de las nano-partículas con la membrana celular de los glóbulos rojos ya que esta interacción puede conducir al daño celular así como la activación plaquetaria, factores de coagulación y formación de trombos (Sushma et al, 2013; Shi J, 2012). Así también la actividad hemolítica de las NPs es importante debido a que al absorberse las NPs en el organismo, entran en contacto con los eritrocitos (Shi J. et al, 2012) y son dirigidas a través del sistema circulatorio hacia los diferentes órganos para su posible eliminación o acumulación (Qiang Li et al, 2013). Los eritrocitos tienen un tiempo de vida largo (120 días) en el cual los eritrocitos atraviesan todo el cuerpo. A pesar de que el tamaño nano-métrico de los NMs les brinda la capacidad de minimizar su reconocimiento y eliminación por el sistema retículo endotelial, obteniendo así un mayor tiempo de circulación sanguínea (Shi J et al, 2012), cambios estructurales de los eritrocitos debido a las NPs provoca el reconocimiento de macrófagos para su fagocitosis (Wen et al, 2012).

El tipo de unión de las nano-partículas con los eritrocitos, determina la vida media de circulación de las nano-partículas. Por ejemplo, Nano-partículas de poliestireno se adhieren a los eritrocitos a partir de uniones electrostáticas e interacciones hidrófobas en ausencia de proteínas plasmáticas (Wen et al, 2012). La hemólisis producida por las NPs está estrechamente relacionado con sus propiedades fisicoquímicas como carga de la superficie, tamaño y estructura mesoporosa sugiriéndose que el efecto hemolítico

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

es debido a la generación de ROS, desnaturalización de proteínas de membrana así como la afinidad de la membrana por las NPs debido a su carga electrostática (Qiang Li et al, 2013).

La prueba de hemólisis es utilizada ampliamente debido a su fácil aplicación y la relevancia de los resultados que arroja referentes a la citotoxicidad de un compuesto y su reactividad de superficie. Los mecanismos por los cuales la actividad hemolítica es prevenida en la sangre han sido atribuidos a diferentes factores como son:

1. Reacciones redox por metales de transición los cuales como el hierro y el cobre pueden ser unidos a las metaloproteínas correspondientes como la transferrina y la albúmina.

2. La presencia de Vitaminas A, C y E, cuya función es eliminar radicales libres, puede proteger a la membrana celular del eritrocito y así prevenir la hemólisis (May et al, 1998).

3. Los mecanismos de las enzimas antioxidantes (la catalasa, glutatión reducido) pueden reducir moléculas (materiales) que inducen estrés oxidativo el cual es causante de rompimiento de la membrana celular (Stocker, 1986). Bronwyn y col (1990) demostraron que la adición de catalasa protege a las células del daño celular y que los iones metálicos están involucrados en los procesos de hemólisis al reaccionar con el H_2O_2 (Reacción de Fenton)

4. Las proteínas, anticuerpos y complemento pueden opsonizar a las partículas extrañas para su posterior fagocitosis. Por ejemplo, el ion Cobre (Cu^{+2}) puede ser quelado por la albumina disminuyendo su presencia en plasma y en consecuencia la hemólisis producida por los agentes oxidantes producidos en la reacción.

Uno de los principales mecanismos de daño de las nano-partículas es la producción de ROS en la membrana del eritrocito, el daño oxidativo resulta en la peroxidación lipídica de la membrana lipídica para una posterior hemólisis (Winterbourn, 1987). La Vitamina C es importante como antioxidante al reaccionar con los radicales libres y así preservar la vitamina E (alfa-tocoferol) en las lipoproteínas de membrana, la cual la protege de la peroxidación lipídica. Así también, la Vit C unida a lipoproteínas de baja densidad (LDL) lo protege de la oxidación mediada por los oxidantes liberados por los monocitos y leucocitos. Las LDL oxidadas son moléculas que favorecen los procesos inflamatorios y atraen a los macrófagos que captan las LDL oxidadas y se transforman en células espumosas (macrófagos unidas a células del musculo liso) produciendo así una placa aterosclerótica. Entonces el reciclaje de

ascorbato por los eritrocitos protege a las lipoproteínas de plasma de un daño oxidativo protegiendo así mismo al eritrocito del estrés oxidativo. (May, 1998). La actividad hemolítica de un nano-material puede ser de valor predictivo en vista de un potencial genotóxico (Bronwyn et al, 1990).



II. ANTECEDENTES

Debido a la exposición cada vez más elevada a los nano-materiales, a la poca información de los efectos adversos de éstos y al debate científico entre los pros y contras de los nano-materiales, es de suma importancia analizar el potencial toxicológico de los mismos en el organismo. Estudios recientes sugieren que los nano-materiales pueden entrar fácilmente al cuerpo atribuidos a sus propiedades fisicoquímicas mencionadas con anterioridad (Shi-Qiang, 2008). Las NPs de TiO_2 pueden ser absorbidas a través del tracto respiratorio, (inhalación), tracto digestivo (ingestión) y por la piel (penetración) siendo llevados hasta órganos clave que se encargan de la distribución como: el riñón, nódulos linfáticos, hígado y cerebro (Shi-Qiang et al, 2008 ; Sumit et al, 2012). Estudios han demostrado que tras la exposición de TiO_2 - NPs por vía nasal se pueden absorber hacia el cerebro causando lesiones patológicas en el hipocampo, cambios neuroquímicos, daños en la corteza cerebral así como acumulación en los niveles de los neurotransmisores por la presencia de las NPs (William et al, 2012). Los nano-materiales tienen una mayor biodisponibilidad que partículas más grandes, así como una mayor captación dentro de células individuales, tejidos y órganos (Hackenberg et al, 2010).

II.1. EFECTOS ADVERSOS DE TiO_2 -NPs

II.1.1. EXPOSICIÓN DÉRMICA

La piel es el primer órgano de defensa y está en contacto con muchos agentes tóxicos a través de tópicos y otros tratamientos que contienen nano-partículas. La piel ha sido el principal tejido de estudio respecto a la exposición del TiO_2 , ya que es el órgano que tiene una mayor exposición al TiO_2 (debido a sus aplicaciones) y a la radiación UV aumentando el riesgo de cáncer (Sanders, 2014). Las partículas de TiO_2 pueden atravesar los estratos de la piel desde la epidermis hasta la dermis ayudado por los movimientos normales que facilitan esta penetración (Sumit et al, 2012; Chen et al, 2008). Oberroister y col (2005) demostraron la penetración de varias NPs a vía linfática y vascular. Ritesh y col (2011) encontraron tras la exposición in vitro de TiO_2 – NP en células de la epidermis de humano la internalización de éstas nano-partículas de

30-100 nm en el citoplasma, vesículas y núcleo a diferencia de partículas de 500 nm las cuales no entraba a la célula.

II.1.2. EXPOSICIÓN INHLATATORIA

El tracto respiratorio es el mayor portal de entrada de partículas extrañas. Tras la exposición por inhalación del TiO_2 , su endocitosis puede ser mediada por la claritina, caveolina y por macropinocitosis (células fagocíticas y no fagocíticas) (Li et al, 2010), así como macrófagos alveolares produciendo citotoxicidad (Sumit et al, 2012). Los macrófagos transportan las NPs a través de la región alveolar a la laringe lentamente eliminando solo una fracción de las NPs depositadas en los pulmones (Borm et al, 2006). Kobayashi y col (2009) observaron en macrófagos alveolares TiO_2 -NPs dentro de fagosomas localizados cerca de la mitocondria. Varios estudios de inhalación de TiO_2 -NPs han demostrado la distribución de NPs a hígado, pulmones, corazón, riñones, bazo y cerebro (Berube et al, 2007; Li et al, 2010), en los cuales se ha observado la producción de ROS, responsables en gran medida de los procesos inflamatorios. Se ha reportado lesión pulmonar causada por la exposición respiratoria a óxidos metálicos. Ratas expuestas por inhalación a NPs de TiO_2 (21 nm) 0.5 – 2.0 mg/m^3 por 6 horas 5 días a la semana por 13 semanas, mostraron efectos pro-inflamatorios y a 10 mg/m^3 un incremento en el número de macrófagos, neutrófilos, aumento en la deshidrogenasa lactina así como fibrosis pulmonar (Handy et al, 2008). Estudios en ratas demostraron una alta incidencia de tumores de pulmón tras la inhalación de altas concentraciones de nano-partículas de TiO_2 (15-40 nm) sin elucidar su mecanismo de toxicidad (Becker et al, 2011).

Kobayashi y col (2009) demostraron que tras la instalación intratraqueal de TiO_2 -NPs de diferentes tamaños (4.6 nm, 23.4 nm y 154.2 nm), NPs más pequeñas (4.6 nm) producen una mayor respuesta inflamatoria en tejido alveolar que NPs de mayor tamaño debido a la diferencia en el área superficial. Tras un mes de la instalación de NPs, no se observó respuesta inflamatoria.

II.1.3. EXPOSICIÓN ORAL

Las NPs pueden pasar al tracto gastrointestinal (TGI) por medio del tracto respiratorio a través del área nasal, por alimentos, agua, cosméticos, drogas y

dispositivos de administración de fármacos. Algunas NPs pueden atravesar el TGI y ser rápidamente eliminadas por las heces y orina, pero algunas pueden ser acumuladas en el hígado durante la primera fase del metabolismo. Wang y col (2007) reportaron que tras una exposición oral a altas dosis de TiO_2 (25 nm y 80 nm), incrementaba la concentración de las enzimas alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y lactato deshidrogenasa (LDH), así como la inducción de necrosis hepática en ratones. Chen y col (2008) realizaron un estudio comparativo entre la toxicidad de NPs de cobre y el material macro-métrico encontrando mayor toxicidad de las NPs reportando daño en hígado, riñón, y bazo. A diferencia de los otros materiales nano-estructurados, se reporta que NPs de óxido de hierro pueden ser acumuladas en el hígado y bazo temporalmente y progresivamente se van disolviendo, el cuerpo va asimilando el hierro de forma natural. El hecho de que estas nano-partículas sean magnéticas es una ventaja a la hora de determinar su localización y cuantificación en los distintos órganos (Levy et al, 2011).

II.1.4. ABSORCIÓN DE TiO_2 - NPs

Tras su paso por el organismo, los NMs pueden encontrarse con diferentes mecanismos de defensa que las pueden eliminar, secuestrar o disolver. Compuestos como la albúmina, lecitina, polietilen glicol, polisorbital 80 o residuos de péptidos, pueden aumentar la entrada de las NPs dentro de la célula, mientras que el polietilen glicol interfiere en la entrada de las NPs en el hígado (Somasundaran et al, 2004). Cuando los NMs son introducidos o absorbidos dentro del sistema circulatorio, la interacción con los componentes de la sangre puede conducir a hemólisis y trombosis. Barbara Rothen y col (2006) analizaron la interacción de los eritrocitos con tres diferentes partículas (metal, óxido metálico y material polimérico sintético sin y con carga positiva y negativa), entre ellas TiO_2 , dónde encontraron, a través de microscopia de transmisión electrónica (TEM), que la carga superficial y el material de las partículas no influenciaron en la entrada al eritrocito concluyendo que los mecanismos de entrada a estas células sanguíneas son a través de canales transmembranales, difusión pasiva o mecanismos de adhesión. Órganos con alto flujo sanguíneo, como hígado y riñones, pueden ser afectados por los NMs (Aillon et al, 2009). En el hígado, modificaciones metabólicas debida a los nanomateriales, por ejemplo en el citocromo P450, puede resultar en hepatotoxicidad por reacciones intermediarias (Lanone et al, 2006)

II.2. PRINCIPALES MECANISMOS DE NANO-TOXICIDAD

Una vez en el organismo las NPs pueden interactuar con diferentes compuestos, moléculas y o elementos pudiendo ocasionar diferentes formas de daño como: desnaturalización de proteínas, daño membranal, daño al ADN, reacciones inmunes y la formación de granulomas, entre otras. Estas formas de daño van a depender de sus propiedades y características fisicoquímicas a través de diferentes mecanismos moleculares (Figura 6). Uno de los puntos más importantes para estudiar los mecanismos nano-toxicológicos es la biocompatibilidad, la cual puede estar dada principalmente por 1) composición del material, 2) tamaño pequeño y 3) forma. Para conocer la respuesta del organismo ante las NPs también es necesario conocer la dosis de NPs que entra al organismo, depósito, dimensiones, durabilidad y defensa. La dosis y el tiempo que las NPs se encuentren en un sitio específico será un determinante potencial de su toxicidad.

La toxicidad puede estar mediada debido al contacto y/o interacción con componentes de las células produciendo: 1) activación de canales iónicos, 2) estrés mecánico, 3) cambios en la morfología celular, 4) desarrollo anormal de la célula, 5) deformación morfológica de componentes celulares, como el núcleo, interrumpiendo sus funciones normales indirectamente a través de la traducción de señales y directamente por el desplazamiento de genes en la matriz nuclear, 6) estrés mecánico el cual lleva a la activación de vías de señalización induciendo la activación de factores de transcripción (p ej. AP-1) y 7) interacción con proteínas. Un ejemplo de este último punto son "*las integrinas*", un grupo de proteínas ligadas directamente al núcleo a través del citoesqueleto influyendo directa e indirectamente en la expresión de genes y movilidad de la célula (Anselme et al, 2010). Se ha observado que NPs se pueden unir a estas proteínas principalmente en la aplicación de biomateriales en el organismo (Yap F et al, 2007). La superficie química de la NPs va a determinar la proteína unida a las integrinas a la cual se unirá, afectando así la función del complejo integrina-proteína (Slater et al, 2008). Las propiedades de los materiales nano-estructurados influyen en la estructura, actividad y estabilidad de las proteínas conjugadas (Denis et al, 2002).

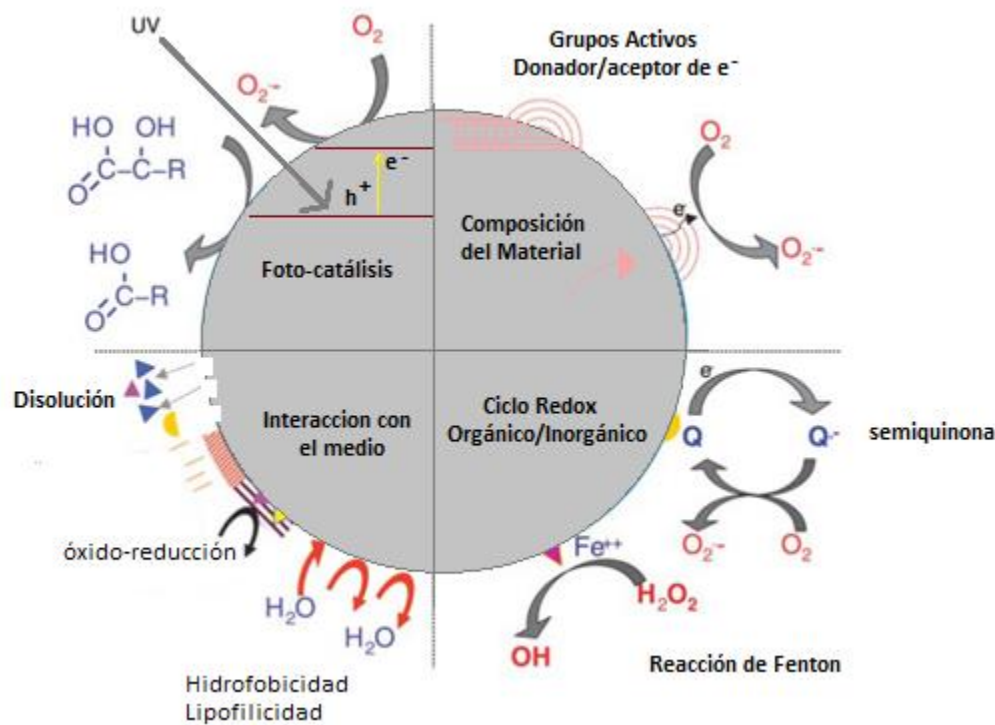


Figura 6. Posibles mecanismos de interacción de las NPs con los tejidos biológicos. (Nel et al, 2006). Estos mecanismos están determinados por la composición del material, estructura electrónica, compuestos unidos en la superficie, revestimiento de la superficie y solubilidad.

II.2.1. Formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Uno de los principales mecanismos moleculares de la nano-toxicidad *in vivo* es a partir de la inducción del estrés oxidativo debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^\bullet) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)) una vez que las defensas antioxidantes se a sobrepasado (Nel et al,2006). En exceso estos radicales libres causan daños a diferentes componentes biológicos tras la oxidación de lípidos, proteínas y ADN. El estrés oxidativo a su vez, juega un rol importante en la activación de procesos inflamatorios a través de factores de transcripción, citocinas y activadores de proteínas implicados en la inflamación (Rahman et al, 2000).

El estrés oxidativo producido por las NPs dentro de las células esta correlacionado con el área superficial y la cantidad de NPs que entren a la célula. Los radicales producidos bajo el estrés oxidativo inducen a lesiones del ADN (Di Virgilio et al, 2010) y dependiendo de la concentración o de un periodo largo de exposición a las NPs puede inhibir la división celular. Palomäki y colaboradores (2009) observaron la proliferación y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

diferenciación celular en osteoblastos tras la exposición de TiO_2 por la activación de células presentadoras de antígenos, así como el $\text{TNF-}\alpha$ las cuales son la primera línea de defensa en el organismo. Se han observado AgNP y TiO_2 en vesículas, núcleo y citoplasma de la célula así como la generación de ROS ocasionando daños en las membranas celulares (Hackenberg et al, 2011; Di Virgilio et al, 2010), ADN e inhibición de la síntesis de ATP. (Palomäki et al, 2009).

Una disminución del estrés oxidativo está asociada con la inducción de enzimas antioxidantes. Los genes Nrf-2 y Nrf-2 activado son los genes que codifican para las enzimas de fase II una vez que la vía y elementos de la respuesta antioxidante son activados.

II.2.2. Reacción de Fenton

Los metales de transición pueden promover la formación de pro-oxidantes (ROS) a partir de la reacción de Fenton ($\text{M}^{++} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{M}^{+++} + \text{OH}^\circ + \text{OH}^\circ$) que desestabiliza el balance entre la habilidad del sistema biológico de producir y desintoxicar las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Curtis 2006). ROS incluye O_2 , OH° , H_2O_2 , las cuales en condiciones normales son constantemente generadas en las células vivas como consecuencia del metabolismo aerobio. Los niveles intracelulares de ROS dependen principalmente de enzimas antioxidantes, enzimas en mitocondria, y la disponibilidad de oxígeno así como en la integridad y funcionalidad de la mitocondria. Cuando la célula es expuesta a situaciones de estrés celular, responde con la producción anormal de ROS resultando estrés oxidativo el cuál es el desequilibrio entre moléculas con poder oxidante derivadas del O_2 y los sistemas antioxidantes. Bajo condiciones patológicas, el incremento de ROS mitocondrial afecta al ADN mitocondrial, producción de ATP, vías de señalización, proliferación, diferenciación y muerte celular programada (Freyre et al, 2011).

II.2.3. Activación del Sistema Inmune

Respecto a la interacción de las NPs con el sistema inmune, varios estudios han demostrado que TiO_2 -NPs pueden acumularse en diferentes órganos generando una respuesta inflamatoria promoviendo la expresión de citocinas durante la respuesta pro-inflamatoria en ratas y ratones (Kermanizadeh et al, 2013; Palomaki et al, 2010; Liu

Ran et al, 2009; Lui Kui et al, 2013). El sistema Reticuloendotelial, el cual está compuesto por células fagocíticas en el hígado, bazo y nódulos linfáticos, elimina o secuestra a las partículas pudiendo cambiar su antigenicidad y la respuesta autoinmune inicial. La interacción de las NPs con las proteínas puede ocasionar interferencia en la función de las enzimas acelerando su desnaturalización o interaccionar en algún sitio específico de la enzima. Al unirse la proteína con la NPs (complejo NPs-proteína) las NPs pueden ser transportadas a través del cuerpo y tener un mayor reconocimiento antigénico a través de las células dendríticas.

Los procesos inflamatorios son iniciados a partir de la activación de la cascada de señalización pro-inflamatoria (p ej. MAPK y NF- κ B), mientras que la muerte celular programada puede resultar de la perturbación mitocondrial y la liberación de factores pro-apoptóticos. Li y col (2010) sugieren que TiO₂-NPs en su fase cristalina anatasa, promueve la generación de NO (óxido nítrico), el cuál inhibe la actividad de las células NK (Natural Killer), primera línea de defensa inmune en ratas.

II.2.4. Daño Mitocondrial

La interacción de los nanomateriales con la mitocondria y el núcleo celular están comenzando a tener sumo interés como las principales fuentes de toxicidad de las NPs. (Unfried et al, 2007). Se ha sugerido que el TiO₂ interrumpe las funciones mitocondriales a través de la formación de radicales libres (Lagopati et al, 2010). La perturbación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, puede llevar a la activación de factores de muerte celular programada (apoptosis) (Nel et al, 2006). Freyre y col (2011) observaron que tras 1 hora de exposición a 40 mg NPs/m³ comerciales (<25 nm, 200-220m²/g), el TiO₂ induce disfunción mitocondrial en tejido pulmonar debido a un descenso de la tasa de control respiratorio y consumo de oxígeno resultando en una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, NADH y aumento de hasta el 50% en la generación de ROS. La formación de ROS es debido a que TiO₂-NPs induce un desacoplamiento entre la cadena de transporte de electrones y la ATP sintasa, afectando así los procesos de fosforilación oxidativa y consumo de ADP incrementando así la glucólisis anaerobia para compensar la disminución en la producción de ATP. A pesar de que TiO₂-NPs no estén localizadas dentro de la mitocondria, estas NPs inducen muerte celular en las células epiteliales bronquiales a través del incremento de los niveles de caspasa 9, iniciando la activación

intrínseca de apoptosis (Shi et al, 2010). La exposición a TiO₂-NPs también ha mostrado la activación de BAX, Citocromo C, y P53, los cuales están involucrados en la inducción de la apoptosis (Ralph et al, 2010). Li Na y col (2010) demostraron que TiO₂-NP se acumulan en el bazo e hígado produciendo congestión, inhibición de la respuesta inmune y apoptosis a través de la alteración de la vía mitocondrial.

II.2.5. Citotoxicidad y Genotoxicidad de TiO₂-NPs

Diferentes estudios han mostrado los efectos cito-tóxicos y geno-tóxicos de las nano-partículas de TiO₂. Nano-partículas de TiO₂ de 20 nm causaron pérdida de la actividad lisosomal y mitocondrial, así como cito-toxicidad y geno-toxicidad a concentraciones de 1 µg/ mL (Di Virgilio et al, 2010). Ritesh y col (2011) demostraron la citotoxicidad de TiO₂ de 50 nm en células humanas de la epidermis debido a la producción de radicales libres y formación de micronúcleos a partir de una concentración de 8 µg/mL. Hackenberg y col (2011) observaron genotoxicidad y citotoxicidad en células mesoquemiales y CHO-K1 a una alta concentración de TiO₂-NP. En contraste Hamzeh y col (2013) no encontraron daño en el ADN en fibroblastos de pulmón de hámster a pesar de la inducción de apoptosis y necrosis por TiO₂-NP.

Una interacción directa entre TiO₂-NPs y el ADN pudiera ser a través de uniones covalentes, daño a la estructura molecular y consecuentemente apoptosis o necrosis celular. Li y col (2009) demostraron que TiO₂-NPs de estructura cristalina anatasa, puede causar alteraciones en la estructura del ADN a través de la inserción en los pares de bases, unión a los nucleótidos, escisión y apoptosis en las células de hígado de rata. La interacción fue a través del Ti y los pares de bases de ADN y la unión a nucleótidos fue a través de la producción del radical OH[°] el cual puede reaccionar con el DNA produciendo 8-hidroxi-guanosina, resultando en la escisión del ADN.

En la siguiente tabla Net y colaboradores (2006) resumen algunos ejemplos que se han corroborado experimentalmente, en donde se ha observado daño a diferentes órganos tras su exposición a TiO₂ NMs. Hasta la fecha las diferentes investigaciones giran en las mismas líneas de investigación debido a los muy variados resultados que se han encontrado al utilizar nano-partículas con la misma composición química.

Tabla 1: Efectos *in vivo* de las Nano-partículas.

Efectos experimentales de NMs	Posible Efecto/daño Fisiológico
Generación de ROS	Daño a la membrana, proteínas, ADN. Estrés oxidativo
Estrés Oxidativo	Enzimas de inducción de la fase II, Inflamación, daño mitocondrial
Daño membranal	Daño de membrana mitocondrial interna, mayor permeabilidad, pérdida de energía, apoptosis, apo-necrosis, citotoxicidad
Inflamación	Infiltración celular, fibrosis, granulomas, aterogénesis.
Absorción por el sistema Retículo-Endotelial.	Disfunción y alargamiento de órganos, Almacenamiento de NPs en hígado, bazo y nódulos linfáticos,
Desnaturalización o degradación de proteínas, absorción en núcleo.	Aumento de la actividad enzimática, daño ADN, auto-antigenicidad, aglutinación de nucleoproteínas.
Absorción al tejido neuronal.	Daño al cerebro y nervios periféricos.
Perturbación de la fagocitosis.	Inflamación crónica, fibrosis, granulomas, disminución de inmunidad innata
Efectos en la coagulación sanguínea.	Aterogenesis, trombosis, infarto al miocardio.
Generación de neo-antígenos.	Autoinmunidad, efectos adyuvantes
Alteración en la regulación del ciclo celular	Proliferación o detención del ciclo celular, mutagénesis, metaplasia, carcinogénesis

II.2.6. Lixiviación de Iones en Solución

Se ha observado que iones de plata (Ag^+) liberados de las matrices de NMs dañan la membrana celular debido a atracciones electrostáticas y a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) pudiendo producir la muerte celular. El grado de hemólisis de NMs que contienen Ag, está determinado por la concentración de ésta en el nano-material y su grado de ionización (Sushma, 2013). Christiane Beer y col. (2012)

demostraron que en soluciones de AgNP una parte de Ag⁺ es libreado siendo más tóxica cuando la fracción inicial de Ag⁺ es más alta. Kim y col (2010) sugieren que la toxicidad de las AgNPs se relaciona principalmente con el estrés oxidativo producido por Ag. En la preparación de las NPs, la sonicación, que generalmente se emplea para romper los agregados, pudiera ser un factor para la disociación de iones metálicos en solución (Handy et al, 2008).

II.3. COMPLEJIDAD DE LA EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE LAS NPs

Una mayor comprensión de los mecanismos que dictan el comportamiento y el destino (biodistribución) de las nano-partículas tras exposición y entrada al organismo es fundamental no sólo para su desarrollo (para diferentes aplicaciones) sino también para la predicción de las potenciales respuestas toxicológicas a estos nano-materiales. En la actualidad, existen muy pocas investigaciones que relacionen las propiedades físico-químicas con el efecto toxicológico de los mismos. Alrededor de 4000 investigaciones referentes a toxicidad de nano-materiales se han realizado hasta la fecha (Magdolenova et al, 2014), obteniendo resultados contradictorios respecto a la toxicidad de estos. Lo anterior debido a que la mayoría de las investigaciones no relacionan las propiedades fisicoquímicas de los nano-materiales y su efecto biológico.

La complejidad de la evaluación toxicológica de los nano-materiales está reflejada en la inconsistencia de las investigaciones debido a: 1) la toxicidad de las NPs depende de sus propiedades fisicoquímicas, las cuáles no son contempladas en la mayoría de las investigaciones, 2) los modelos *in vivo* (cruciales en la evaluación toxicológica), son diferentes en cada investigación (especies diferentes) y ningún modelo puede predecir con exactitud la toxicidad humana, 3) se utilizan diferentes líneas celulares e incluso utilizando las mismas líneas celulares los resultados son inconsistentes y 4) las condiciones experimentales varían en cada laboratorio (Zhan y col, 2012). En la Tabla 2 se resumen algunos resultados producto de evaluaciones toxicológicas tanto *in vitro* como *in vivo*, donde se puede observar las diferentes variables utilizadas para los experimentos desde concentración, modelo biológico, sexo, línea celular, vía de exposición, entre otras.

Tabla 2: Estudios *In vivo* e *in vitro* de la toxicidad de TiO₂-NP

IN VIVO				
Referencia	Propiedades Físicoquímicas	Modo de Exposición	Dosis	Resultado
Ma Linglan et al, 2009	TiO ₂ Anatasa Cristalina 5 nm	Intraperitoneal Ratones (hembra) HIGADO	0, 10, 50, 100, 150 mg/kg todos los días x 14 días	A altas dosis: ↑ peso, ↑ Nivel de enzimas hepáticas ↑ metabolismo de lípidos. Histología del hígado: vasodilatación, basofilia, isquemia focal y congestión en la VP (100-150 mg/kg) ↑ IL-1, IL-4, IL-6 IL-10, NK, TNF-α
Xu Jiaying et al, 2013	TiO ₂ 42.3 nm	Intravenosa Ratones (hembras/macho) HIGADO	0, 140, 300, 645, 1387 mg/kg 14 días	↓ Peso P. hepático: Normal ↓ [Bilirrubinas] ↑ WBC 645 mg/kg Histología de hígado: Células de inflamación, vacuolización, degeneración hidrópica alrededor de VP.
Chen et al, 2009	TiO ₂ 80-110 nm Anatasa Cristalina	Intraperitoneal Ratones (hembras/macho) HIGADO	0, 324, 648, 972, 1296, 1944, 2592 mg/kg 24, 48 horas, 7 y 14 días	↓ Peso P. Hepático: ↑ 24 hras ↑ 48 horas Acumulación en vaso e hígado principalmente. Histología hígado: Fibrosis alrededor VP, degeneración hidrópica, degeneración grasa, cuerpos apoptóticos y células de inflamación.
Cui et al, 2010	TiO ₂ 7 nm Anatasa	Intragástrico Ratones (hembra) HIGADO	5, 10, 50 mg/kg	5 mg/kg No ≠ Control ICR: 10 y 50 mg/kg: cuerpos apoptóticos, condensación de la cromatina. ROS: ↑ 1.3 veces Expresión de genes: ↓ SOD, CAT, GSH, MT, HSP-70, P- 53 ↑ Cit P450 1 ^a
Yanmei Duan et al, 2010	TiO ₂ 5 nm Anatasa	Intragástrico Ratones (hembra) HIGADO	0, 62.5, 125, 250 mg/kg c/2 días x	↓ Peso Histología del Hígado: Congestión de los sinusoides, pérdida de la

			30 días.	arquitectura. P. Hepático: ↑ enzimas hepáticas, ↓ Bilirrubinas y R A/G ↑ TG ↓ WBC, RBC, HGB ↑ PLT, MVP ↓ IL-2 ↑ NO
Jiangxue Wang et al, 2007	TiO ₂ 25, 80 y 155 nm	Intragástrica Ratones Hembras/ machos HIGADO	5 g/kg 14 días	Peso: No ≠ ALT/AST: ↑ 25 nm LDH: ↑ 25 nm, 80 nm Histología del hígado: 80 nm Degeneración hidrópica alrededor de VP, necrosis irregular
Li Na et al, 2009	TiO ₂ Anatasa 5 nm	Intraperitoneal Hembras/ machos HIGADO	5, 10, 50, 100, 150 mg/kg c/día x14 días	↑ Peso; 50, 100 y 150 mg/kg [Ti] en ADN Hígado: ↑ [Ti] conforme ↑ [TiO ₂] Espectro 250 nm ↑ [TiO ₂] ↓ Abs. Escisión ADN 150 mg/kg
Jiangxue	Nanotubos TiO ₂ Anatasa 45 nm x 13 nm DLS:183.7- 282.0	Intraarticular Ratones Machos HIGADO	0.2, 2.0, 20.0 mg/kg 7 días	P. Hepático: ↑ a 2.0 y 20 mg/kg Histología del Hígado: Vacuolas y células de inflamación alrededor de VC, dilatación de sinusoides.
Ma Linglan et al, 2009	TiO ₂ Estructura: Anatasa- Cristalina 5 nm	Intraperitoneal Ratones (hembra) CEREBRO	0, 10, 50, 100, 150 mg/kg todos los días x 14 días	A altas dosis: 100-150 mg/Kg ↑ NO ↓ GLU ↓ Actividad de SOD, CAT, APx, GSH ↑ ROS, MDA Histología: células inflamatorias, escisión de neuronas.
Cho Wan-Seob et al, 2010	TiO ₂ Anatasa 30-40 nm Area Superficial: 27.5 m ² /g DLS: 119.1 Potencial zeta: 28.5 mV	Intrabroncoalveolar Ratones PULMON	150 cm ² /rat	Sin respuesta inflamatoria Sin lesión pulmonar

Grassian et al, 2007	TiO ₂ <25 nm Área superficial 210 m ² /g	Agua nebulizada Ratones PULMON	4 hrs/día/10 días	↑ Respuesta Inflamatoria ↓ IL-6, IL-10 ↑ Proteínas, LDH
Kobayashi, Kobayashi et al, 2009	TiO ₂ Anatasa 4.9, DLS: 19.0 área superficial: 316	Intratraqueal PULMON	5 mg/kg	7 días Infiltración macrófagos. Hipertrofia de tejido alveolar Células de inflamación 28 días Macrófagos.
	TiO ₂ Anatasa 23.4 , DLS: 28.4 área superficial: 66			7 días Infiltración macrófagos. Células de inflamación 28 días Macrófagos.
	TiO ₂ Anatasa 154.2, DLS: 176.3 área superficial: 10			7 días Infiltración macrófagos. Células de inflamación 28 días Macrófagos.
Li Na et al, 2010	TiO ₂ Anatasa 7 nm Área superficial 173.2 m ² /g	Intraperitoneal Ratones (hembra) BAZO	5, 50, 150 mg/kg c/día/45 días	A altas dosis: 50-150 ↑ Peso Bazo Acumulación de Ti Apoptosis Condensación de cromatina, vacuolización necrosis celular, ↑ ROS ↑ Caspasa 3, Caspasa 9, Bax, Citocromo c ↓ Bcl-2

IN VITRO

Referencia	Propiedades Físicoquímicas	Modo de Exposición	Dosis	Resultado
Saquib Quaiser et al, 2012	TiO ₂ Estructura: Rutilo-Cristalina 30.6 nm Eg= 4.0 DLS= 152 nm	Cultivo celular Células amnióticas de humanos	0,0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10 µg/mL 24 horas	TEM: vesículas en citoplasma con NPs MTT: ↓ 24.5% NRU: ↓ 42.5% ROS: ↑ 1.87 veces Catalasa: ↓ 46.3% GSH: ↓34.6% Prueba cometa (+) 10 y 20 µg/mL

Di Virgilio et al, 2010	TiO ₂ 20nm Área superficial: 142 m ² /g	Células de ovario de Hamster (CHO-k1)	0.5, 10, 25, 50, 100 µg/mL 24 horas	NRU: ↓ 40% MTT: ↓ 35% CBMN: ↑ Formación de Micronúcleos. TEM: Fagocitosis de TiO ₂ -NPs dentro de vesículas intracelulares
Ritesh K. Shukla et al, 2011	TiO ₂ Anatasa 50nm Agua: DLS - 124.9, Potencial Zeta: -17.6 Medio de cultivo: DLS: - 171.4 mV Potencial zeta - 11.5 mv	Células humanas de la epidermis	0.008, 0.08, 0.8, 8, 80 µg/mL 48 horas	TEM: Presencia de TiO ₂ -NP en núcleo y citoplasma. Viabilidad celular: ↓ 25% Micronúcleos: ↑ 1.78 veces ROS: ↑ 79% GSH: ↓ Hidroxiperóxido: ↑
Hackenber g Stephan et al, 2010	TiO ₂ Anatasa 15 – 30 nm Forma esférica DLS: 285 nm	Células epiteliales nasales humanas.	0, 10, 25, 50, 100 µg/mL 24 horas	TEM. Localización en citoplasma y núcleo. Viabilidad: 95-76% Si efectos genotóxicos.
Mahsa Hamzeh et al, 2013	TiO ₂ Anatasa 100% 5.9nm Área sup. 280.9 DLS 460 Potencial zeta: - 12 TiO ₂ Anatasa 83% Rutilo 17% 34.1 nm Área sup. 48.9 DLS 400 Potencial zeta: - 12 TiO ₂ Amorfo 169 nm Área sup. 9.8 DLS 365 Potencial zeta: - 13	Células de Fibroblastos de pulmón Hamster PULMON		MTT: 50% Apoptosis: 20.6 MTT: 50% Apoptosis: 30.6 MTT: 60% Apoptosis: 12.3

III. JUSTIFICACIÓN

Una de las prioridades para el ser humano en la actualidad son los avances tecnológicos los cuales facilitan cada vez más la vida del hombre en sus necesidades primarias proporcionando una mejor calidad de vida. La nanotecnología forma parte de este mundo novedoso el cual pretende mejorar los materiales disminuyendo costos y aumentando eficiencia, dos términos claves para la industria de la tecnología. En los últimos 20 años los avances en la nano-tecnología han aumentado en función de las nuevas necesidades del ser humano. Debido a que las propiedades fisicoquímicas de los nano-materiales se ven mejoradas, se han utilizado en varios campos. En este contexto se ha visto resultados favorables en diferentes áreas de la industria y el conocimiento científico, por lo cual la síntesis y producción descontrolada de estos nano-materiales ha venido en aumento, provocando el incremento de estas nano-partículas en el medio ambiente.

Por lo anterior, en los últimos años se ha visto un aumento en el interés de la comunidad científica respecto a los efectos adversos que esta nueva tecnología puede atraer al medio ambiente y por consiguiente al ser humano, ya que estamos en contacto directo con esta nueva nano-tecnología con diferentes productos que consumimos a diario, así como indirectamente debido a nano-partículas producto de la contaminación y aquellas que se generan naturalmente por procesos geológicos. Este interés ha llevado a demostrar que nano-partículas que actualmente se encuentran en el mercado pueden producir efectos tóxicos en diferentes líneas celulares llegando incluso a la muerte celular, geno-toxicidad y mutaciones (Hackenberg et al, 2010; Ritesh et al, 2011; Hamzeh et al, 2013). El incremento en la evaluación del riesgo del TiO_2 es debido a su aumento en la exposición ambiental y ocupacional siendo estimada una producción anual de este nano-material entre 5000 y 6400 toneladas (Muller et al, 2008).

Dentro de nuestro grupo de investigación, se ha logrado implementar rutas químicas para la producción de diversos nano-materiales con aplicaciones medio ambientales. El laboratorio sigue los principios de la química verde por lo que busca la síntesis de compuestos amigables con el ambiente como es el caso del TiO_2 , el cual es uno de los nano-materiales ampliamente utilizado por sus características semiconductoras y foto-catalíticas además de ser considerado ambientalmente benigno. La finalidad del dopaje del TiO_2 con diferentes metales de transición es la

modificación del espectro de absorción del TiO_2 a luz visible (Mohammad et al, 2013), aprovechando también las propiedades de los metales para sus diferentes aplicaciones. La plata posee alta conductividad térmica y eléctrica, es un metal moderadamente suave de color blanco y refleja el 95% de la luz que incide sobre ella, no se oxida fácilmente; su principal aplicación es como agente bactericida. El hierro, por su parte, es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza, es un buen agente reductor (pudiéndose oxidar hasta el estado Fe^{+2} , Fe^{+3} , Fe^{+6}), maleable y presenta propiedades magnéticas.

Antes de aplicar los materiales a campo, es necesario evaluar la toxicidad de los mismos. A pesar de las numerosas aplicaciones que hoy en día se da a los nano-materiales, todavía, existen muy pocas investigaciones, referentes a estudios de toxicidad de los mismos (Magdolenova et al, 2014), por lo cual es indispensable hacer análisis toxicológicos a los nano-materiales producidos generando así beneficios sin riesgo. Las propiedades físicas y químicas únicas que hacen a los nano-materiales tan útiles en el mercado también hacen sus interacciones con los sistemas biológicos difíciles de anticipar y de importancia crítica para explorar. Por lo anterior, una mejor comprensión de la correlación entre las propiedades físico-químicas y toxicidad facilitará la evaluación de los riesgos de los nano-materiales.

IV. HIPÓTESIS

El dióxido de titanio (TiO_2) es un material semiconductor que ha sido ampliamente utilizado debido a sus excelentes propiedades Redox y baja o nula toxicidad. El espectro de absorción de este material cae dentro de la región UV, por lo cual, el dopaje del mismo con iones metálicos ($\text{TiO}_2\text{-M}^+$) da lugar a la creación de materiales activos a la luz visible. Los materiales dopados de TiO_2 presentan baja toxicidad asociada a su tamaño (nano-métrico), o bien, al desprendimiento de iones metálicos en solución.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la toxicidad de metales y óxidos metálicos nano-estructurados *in vitro* e *in vivo* empleando pruebas bioquímicas, inmunológicas e histológicas.

VI. OBJETIVO ESPECIFICOS

- Evaluar la toxicidad los óxidos metálicos (TiO_2 , TiO_2 Sigma-Aldrich, $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$) nano-estructurados en células rojas humanas.
- Evaluar la influencia del metal Ag y ion metálico Fe^{+3} en el carácter tóxico de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$
- Evaluar la toxicidad de TiO_2 Sigma-Aldrich, $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$, nano-estructurados en ratas Wistar empleando pruebas bioquímicas, inmunológicas e histológicas.

VII. METODOLOGÍA

VII.1. SÍNTESIS DE NANO-PARTÍCULAS

Consideraciones generales. Los reactivos empleados en el trabajo experimental son de la más alta pureza y fueron utilizados como recibidos.

VII.1.1. SÍNTESIS DE DIÓXIDO DE TITANIO (TiO₂)

1. Preparar una solución A con 20 mL de ácido acético añadiendo lentamente 10 mL de tetraisopropóxido de titanio.
2. Preparar una solución B con 30 mL de agua desionizada y 0.9 g de goma arábica.
3. Calentar Solución B a 60°C por 30 minutos. Enfriar.
4. Agregar gota a gota solución B a la solución A con agitación constante hasta la formación de un gel.
5. La mezcla se deja calentando hasta la formación de polvos.
6. Homogenizar y calcinar a 350 °C por 3 hrs.
7. Lavar con H₂O-Etanol 2:1.
8. Centrifugar y decantar. Repetir 3 veces.
9. Secar los nano-polvos en la parrilla.

VII.1.2. SÍNTESIS DE DIÓXIDO DE TITANIO DOPADO CON Fe⁺³ (TiO₂-Fe⁺³)

1. Preparar una solución A con 10 mL de ácido acético glacial, 0.071 g (Fe⁺³ 1%); 0.213 g (Fe⁺³ 3%) ó 0.355 g (Fe⁺³ 3%) de Fe (NO₃)₃ •9H₂O
2. Agitar hasta diluir completamente.
3. Agregar lentamente 5 mL de isopropóxido de titanio (IV)
4. Preparar una solución B con 15 mL de agua desionizada y 0.45 g de goma arábica.
5. Calentar a 60°C por 30 minutos.
6. Dejar enfriar.
7. Agregar lentamente la solución B a la solución A

8. Agitar hasta la homogenización de la mezcla.
9. La mezcla se deja calentando hasta la formación de polvos.
10. Homogenizar y calcinar a 350 °C por 3 hrs.
11. Lavar con H₂O-Etanol 2:1.
12. Centrifugar y decantar. Repetir 3 veces.
13. Secar los nano-polvos en la parrilla.

VII.1.3. SÍNTESIS DE DIÓXIDO DE TITANIO DOPADO CON PLATA (TiO₂-Ag)

TiO₂-Ag 1% Y TiO₂-Ag 5%

1. Preparar una solución A con 20 mL de ácido acético glacial, 0.029 g (Ag 1%); 0.145 g (Ag 5%); de AgNO₃
2. Agitar hasta diluir completamente.
3. Agregar lentamente 10 mL de isopropóxido de titanio (IV)
4. Preparar una solución B con 30 mL de agua desionizada, 0.9 g de goma arábica y 0.206 g de citrato de sodio.
5. Calentar a 60°C por 30 minutos.
6. Dejar enfriar.
7. Agregar lentamente la solución B a la solución A
8. Agitar hasta la homogenización de la mezcla.
9. La mezcla se deja calentando hasta la formación de polvos.
10. Homogenizar y calcinar a 350 °C por 3 hrs.
11. Lavar con H₂O-Etanol 2:1.
12. Centrifugar y decantar. Repetir 3 veces.
13. Secar los nano-polvos en la parrilla.

TiO₂-Ag 3%

1. Preparar una solución A con 30 mL de ácido acético glacial, 0.1305 g (Ag 3%)nde AgNO₃
2. Agitar hasta diluir completamente.
3. Agregar lentamente 15 mL de isopropóxido de titanio (IV)
4. Preparar una solución B con 45 mL de agua desionizada, 1.35 g de goma arábica y 0.9033 g de citrato de sodio.

5. Calentar a 60°C por 30 minutos.
6. Dejar enfriar.
7. Agregar lentamente la solución B a la solución A
8. Agitar hasta la homogenización de la mezcla.
9. La mezcla se deja calentando hasta la formación de polvos.
10. Homogenizar y calcinar a 350 °C por 3 hrs.
11. Lavar con H₂O-Etanol 2:1.
12. Centrifugar y decantar. Repetir 3 veces.
13. Secar los nano-polvos en la parrilla.

VII.2. CARACTERIZACIÓN

La caracterización de los compuestos sintetizados se llevó a cabo por medio de microscopia electrónica de barrido (SEM), Difracción de electrones, espectrofotometría de energía dispersiva (EDX) y Zetametro.

VII.3. PRUEBA *IN VITRO*:

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE NANO-PARTÍCULAS DE TiO₂, TiO₂ Sigma-Aldrich, TiO₂-Ag 0.5%, TiO₂-Ag 1.5%, TiO₂-Ag 2.5%, TiO₂-Fe⁺³ 1%, TiO₂-Fe⁺³ 3%, TiO₂-Fe⁺³ 5% EN GLOBULOS ROJOS HUMANOS

VII.3.1. PRUEBA DE HEMÓLISIS

Las muestras deben de ser procesadas una vez tomada la muestra para evitar daños celulares que pueden ser observados conforme aumenta el almacenamiento de la muestra. Estos cambios pueden ser: aumento en los niveles de potasio, lactato y hemoglobina libre, depleción de los niveles de ATP, cambios en la morfología celular, liberación de lípidos de la membrana y lesión oxidativa (Doctor y Spinella, 2012). La figura 7 muestra las diferentes variables evaluadas en la prueba *in vitro* utilizando diferentes condiciones de luz, muestra y temperatura

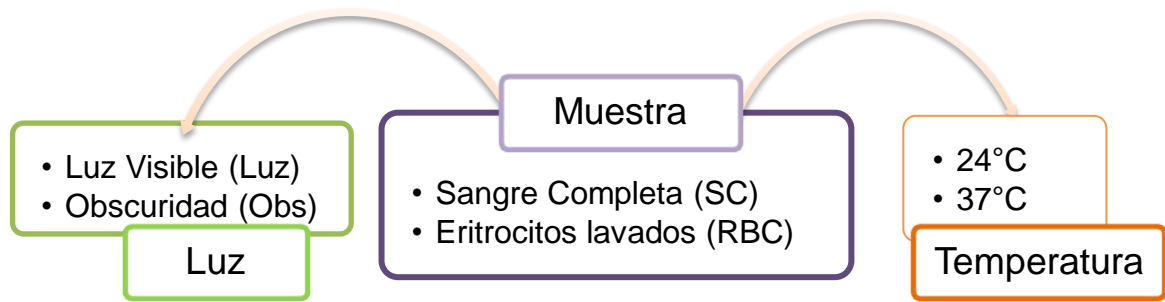


Figura 7: Variables utilizadas *in vitro*.

1. Analizar cada material según el siguiente diagrama:

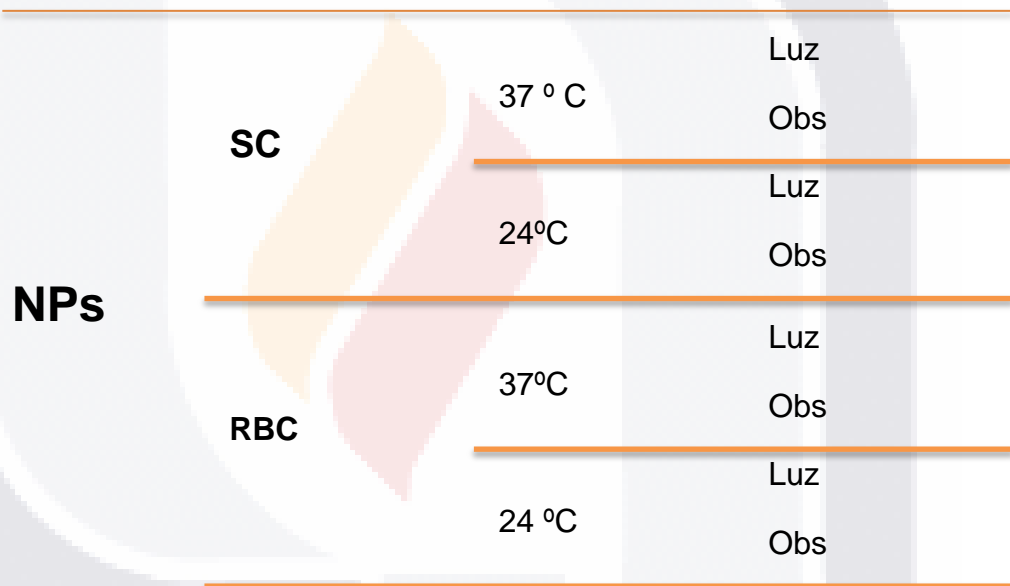


Figura 8: Evaluación de la toxicidad de NPs *in vitro* en células rojas humanas

2. Realizar por triplicado cada una de las variables (8) en condiciones de luz y oscuridad a condiciones de 24°C por 24 horas y a 37°C por 12 hrs.
3. Muestra de sangre: Tomar 10 mL de muestra sanguínea con heparina:
 - a. Sangre Completa: Se refiere al contenido de la sangre: paquete globular y plasma sanguíneo. Verificar que la muestra no este hemolizada
 - b. RBC 1:3: Centrifugar muestra a 4000 rpm por 5 min. Retirar el plasma y lavar 3 veces el paquete globular con Solución Salina Fisiológica (SSF). Diluir 1:3 con SSF.

4. Realizar curva “*dosis-respuesta*” de los nano-materiales (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1.0 mg/mL) en una dilución final de muestra 1:100.
5. Una vez transcurrido el tiempo, centrifugar por 5 min a 4000 rpm
6. Observar si ocurre hemólisis de células rojas.

VII.3.2. ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

1. Leer a 540 nm frente a un blanco (control negativo).
2. Obtener el porcentaje de actividad hemolítica por la siguiente formula:

$$\frac{Abs\ Muestra}{Abs\ Control\ Positivo} * 100$$

VII.3.3. CONCENTRACIÓN DE IONES EN SOLUCIÓN

1. Separar el sobrenadante a un tubo limpio (previamente lavado con HNO₃ 10% y H₂O destilada)
2. Filtrar la muestra
3. Llevar a pH 2.0 con HNO₃ al 30%. Si es necesario centrifugar y filtrar nuevamente la muestra para evitar tener materia orgánica o nano-partículas en solución.
4. Leer por espectrofotometría de absorción atómica las muestras.
5. En el caso de la determinación de iones hierro, es necesario leer los controles positivos y negativos.

Control Iones en solución (SSF+NPs): Se lleva a cabo la lectura de las nano-partículas en SSF en las mismas condiciones, determinando la concentración de iones que se está liberando del material.

VII.3.4. INTERACCIÓN DE LAS CELULAS ROJAS CON TiO₂-Ag por SEM

1. Incubar la muestra de eritrocitos lavados (ver punto 3.1 paso 3-b) por una hora con TiO₂-Ag (0.5%, 1.5% y 2.5%) a una concentración de 1.0 mg/mL en condiciones de luz.

2. Tomar 10 μ L de la muestra anterior y colocarlos en 1 mL de glutaraldehído al 2%
3. Incubar por 30 min
4. Lavar tres veces con acetona.
5. Leer por SEM

VII.4. PRUEBA *IN VIVO*:

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE NANO-PARTÍCULAS DE TiO_2 , $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ EN RATAS WISTAR

VII.4.1. PRUEBA AGUDA.

1. Realizar el estudio en ratas Wistar machos de 200-250 g de peso.
2. Dividir los animales en cuatro grupos (N=10/grupo):
 - i. Testigos (recibirán el vehículo del TiO_2)
 - ii. Tratados- TiO_2 (5 mg/Kg, i.v., nano-polvo de Sigma-Aldrich)
 - iii. Tratados- $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 1.5% (5 mg/Kg, i.v.)
 - iv. Tratados- $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 3% (5 mg/Kg, i.v.).
3. Obtener muestras de sangre de la arteria caudal a los 1, 7 y 14 días para su análisis.
4. Bajo condiciones de anestesia, obtener el hígado de los animales para analizar el posible daño estructural por microscopía óptica (tinción con hematoxilina & eosina).

VII.4.2. PRUEBA SUB-AGUDA.

1. Realizar el estudio en ratas Wistar machos de 250-300 g de peso.
2. Dividir los animales en tres grupos (N=10/grupo):
 - i. Testigos (recibirán el vehículo del TiO_2)
 - ii. Tratados- TiO_2 (5 mg/Kg, i.v., nano-polvo de Sigma-Aldrich)
 - iii. (Tratados- $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 3% (5 mg/Kg, i.v.).
3. Administrar dosis de NPs (5 mg/kg i.v.) cada 7 días hasta finalizar el tratamiento.
4. Obtener muestras de sangre de la arteria caudal a los 29, y 56 días

5. Bajo condiciones de anestesia, obtener el hígado de los animales para analizar el posible daño estructural por microscopía óptica (tinción con hematoxilina & eosina) a los 56 días

VII.4.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE HÍGADO.

Respecto a las pruebas bioquímicas en suero, se realizó un perfil hepático incluyendo los principales marcadores biológicos que indican un daño temprano en hígado (Tabla 3).

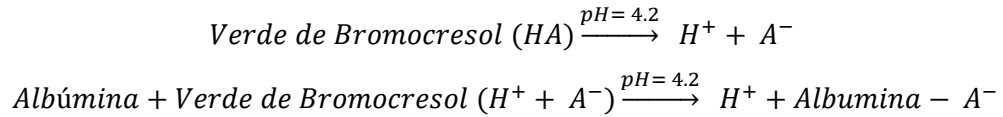
Tabla 3: Parámetros bioquímicos para la determinación de daño en hígado

PARÁMETRO	MÉTODO
* Concentración de albúmina en suero	Dumas et al, 1971.
* Concentraciones de proteínas totales en suero	Peterson, 1977.
* Concentraciones de bilirrubinas en sangre	Muraca et al, 1988.
* Actividades séricas de AST/TGO y de ALT/TGP	Schlebusch et al, 1974.
* Actividad sérica de fosfatasa alcalina	Moss et al, 1987

VII.4.3.1. ALBÚMINA EN PLASMA

La albúmina, una de las más importantes proteínas plasmáticas producidas en el hígado. Entre sus múltiples funciones se incluye nutrición, mantenimiento de la presión osmótica y transporte de sustancias como Ca^{++} , bilirrubina, ácidos grasos, drogas y esteroides. Alteraciones en los valores de albúmina indican enfermedades del hígado, desnutrición, lesiones de la piel como dermatitis, quemaduras severas o deshidratación. Los valores normales son de 3.5 a 5.0 g/dL

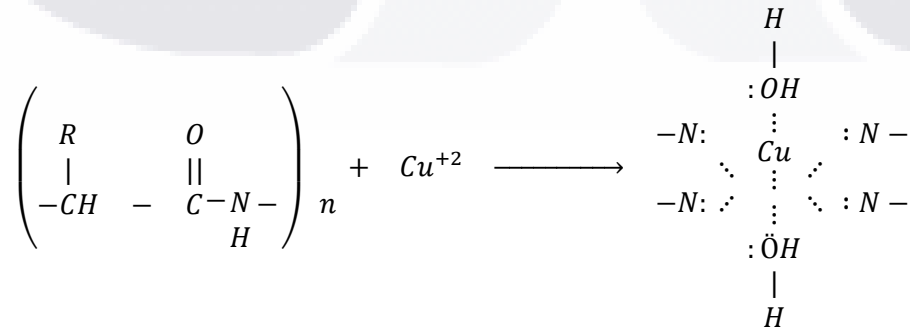
La albúmina reacciona con el colorante verde de bromocresol el cual se disocia en medio ácido (~4.0) cuya forma aniónica se fija a la albumina, produciéndose un complejo coloreado albúmina-verde de bromocresol.



VII.4.3.2. PROTEÍNAS TOTALES EN SUERO

Las proteínas totales miden la cantidad total de dos clases de proteínas en la porción acuosa de la sangre: albúmina y globulina. La albúmina ayuda a impedir que se escape el líquido fuera de los vasos sanguíneos y las globulinas son parte importante del sistema inmunitario. Esta prueba se hace con frecuencia para diagnosticar problemas nutricionales, enfermedad renal o enfermedad hepática. Además, su determinación es útil en la detección de: 1) Hiperproteinemia producida por hemoconcentración, deshidratación o aumento en la concentración de proteínas específicas y 2) Hipoproteinemia por hemodilución debida a un defecto en la síntesis proteica, hemorragias o catabolismo proteico excesivo. Los valores normales en adultos son de 6.6 a 8.3 g/dL.

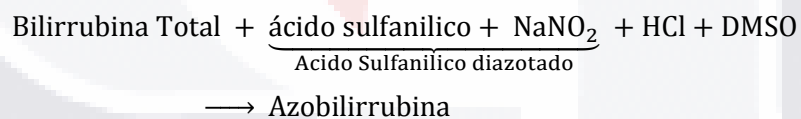
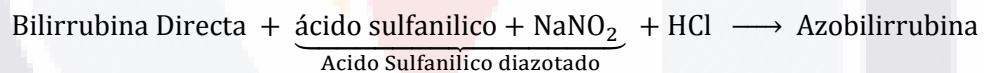
Cuando se tratan las muestras de suero con iones de cobre (Cu^{+2}) en solución alcalina, se forma un complejo coloreado entre los iones de Cu^{+2} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos (-CO-NH-) de las proteínas. El color violeta desarrollado es directamente proporcional al número de enlaces peptídicos de las proteínas.



VII.4.3.3.BILIRRUBINAS EN SANGRE

La bilirrubina, originada principalmente por la degradación de la hemoglobina, es transportada del bazo al hígado y se excreta en la bilis. El aumento de la bilirrubina total puede ser producida por: aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas y presencia de drogas; mientras que un aumento en los niveles de bilirrubina directa puede ser producido por: colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas. Valores normales de la bilirrubina total pueden llegar hasta 1.10 mg/dL, mientras que de la bilirrubina directa de hasta 0.25 mg/dL

Los niveles de bilirrubina se determinan en suero mediante un método no enzimático a través de la reacción diazotación. La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucurónido (bilirrubina directa) y bilirrubina libre (bilirrubina indirecta) ligada a la albúmina, sólo la primera reacciona en medio acuoso mientras que la bilirrubina indirecta se solubiliza con dimetilsulfóxido (DMSO) para que reaccione. En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada.



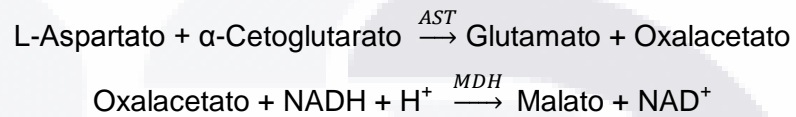
$$\text{Bilirrubina Indireta} = \text{Bilirrubina Total} - \text{Bilirrubina Directa}$$

VII.4.3.4.ACTIVIDAD SÉRICA DE TGO/AST

La enzima aspartato aminotransferasa (AST) es una enzima intracelular, que se encuentra en niveles altos en el músculo del corazón, células del hígado, las células del músculo esquelético y en menores cantidades en otros tejidos. Aunque un nivel elevado de AST en suero no es específico de enfermedad hepática se emplea principalmente para su diagnóstico y seguimiento, junto con otras enzimas como la alanina aminotrasferasa y la

fosfatasa alcalina. También se emplea en el control post-infarto, en pacientes con desórdenes del músculo esquelético, y en otras afecciones. Los valores normales pueden llegar a ser hasta 38 U/L en hombres y 31 U/L en mujeres.

La enzima AST inicialmente llamada transaminasa glutamato oxaloacética (TGO) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α-cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH:

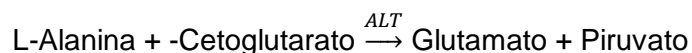


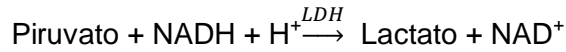
La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra ensayada

VII.4.3.5. ACTIVIDAD SÉRICA DE TGP/ALT

La alanina aminotransferasa (ALT) es una enzima intracelular, que se encuentra principalmente en las células del hígado y el riñón. Su mejor aplicación es en el diagnóstico de las enfermedades del hígado. Se observan niveles elevados en enfermedades hepáticas como la hepatitis, enfermedades de los músculos y traumatismos. Cuando se emplean en conjunción con la AST ayuda en el diagnóstico de infartos de miocardio, ya que el valor de la ALT se mantiene dentro de los límites normales y aumenta en los niveles de AST. Los valores normales pueden llegar a ser hasta 40 U/L en hombres y 32 U/L en mujeres.

La enzima ALT inicialmente llamada transaminasa glutámico pirúvica (TGP) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α-cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH:



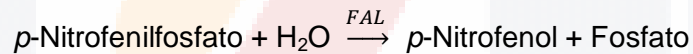


La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra ensayada

VII.4.3.6. ACTIVIDAD SÉRICA DE FOSFATASA ALCALINA

Las fosfatasas alcalinas (FALK) son enzimas que se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta su presencia en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón. Tiene importancia clínica tanto su aumento como su disminución de los niveles en plasma. Esta enzima aumenta en: enfermedades óseas, obstrucciones hepáticas, hepatitis, hepatotoxicidad por medicamentos y osteomalacia. Su disminución en suero es debida a hipotiroidismo congénito y déficit de vitamina C.

La FALK cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (pNPP) a pH 10,4 liberando p-nitrofenol y fosfato, según la siguiente reacción:



La velocidad de formación del p-Nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra ensayada

VII.4.4. PRUEBAS HISTOLÓGICAS EN HÍGADO.

Determinar el daño producido en las células del hígado a través de análisis histológicos por la tinción de hematoxilina y eosina por microscopia óptica.

VII.4.4.1. FUNDAMENTO

Los compuestos celulares se combinan con la eosina o hematoxilina debido a la presencia de agrupaciones moleculares ácidas o básicas en la célula que se unen a los

cromógenos básicos y ácidos de los colorantes, formando sales insolubles. La hematoxilina es un colorante básico (carga eléctrica positiva), por lo tanto son colorantes catiónicos. Tienen afinidad por los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Los núcleos se tiñen a partir de la oxidación de la hematoxilina a hemateína a la que se añade una sal metálica como aluminio, plomo o hierro como mordente. Los núcleos se tiñen de color azul o violeta. La eosina es un colorante ácido con carga eléctrica negativa (colorantes aniónico), la cual se une al extremo de la cadena de aminoácidos que integran las proteínas citoplasmáticas. Por lo tanto la eosina se encarga de teñir el citoplasma y material citoplasmático.

VII.4.5. PRUEBAS INMUNOLÓGICAS

Determinar la concentración de Interleucinas en plasma, a través del análisis de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), utilizando kits comerciales (Invitrogen) específicos para interleucinas en ratas. Evaluar: Interleucina 2 (KRC0021); Interleucina 6: (KRC0061); Interleucina 10: (KRC0101), Interferón gama: (KRC4021) y Factor de Necrosis Tumoral alfa: Invitrogen (KRC3011).

VII.4.5.1.INTERLEUCINA 2 (IL-2):

Citocina producida por las células T activadas por el antígeno que actúa de forma autocrina estimulando la proliferación de las células T y potencia la muerte celular programada de las células T activadas por el antígeno. Enzima inductiva y autorreguladora de la respuesta inmune mediada por las células T. La IL-2 estimula la proliferación y las funciones efectoras de las células NK y células B.

El anticuerpo IL-2 se une a un antígeno IL-2 (muestra) seguido de la unión a un segundo anticuerpo marcado específicamente para el reconocimiento del determinante antigénico. La enzima estreptavidina-peroxidasa se encuentra unida covalentemente al anticuerpo catalizando la formación de O_2 y H_2O a partir de H_2O_2 . El oxígeno reacciona con el cromógeno tetrametilbenzidina dando una coloración amarilla, la cual absorbe a una longitud de onda de 450 nm. La reacción catalítica va a ser dependiente de la concentración de antígeno presente en la muestra y el tiempo de reacción antes del bloqueo.

VII.4.5.2.INTERLEUCINA 6 (IL-6):

Citocina producida por células como: macrófagos, células endoteliales, fibroblastos entre otros. Interviene en la inmunidad tanto innata como adaptativa. Estimula la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, así como el crecimiento de los linfocitos B productores de anticuerpos.

El anticuerpo IL-6 se une a un antígeno IL-6 (muestra), otro sitio del anticuerpo se une a un anticuerpo marcado específico para epitopos del antígeno. La enzima estreptavidina-peroxidasa se encuentra unida covalentemente al anticuerpo catalizando la formación de O_2 y H_2O a partir de H_2O_2 . El oxígeno reacciona con el cromógeno tetrametilbenzidina dando una coloración amarilla, la cual absorbe a una longitud de onda de 450 nm. La reacción catalítica va a ser dependiente de la concentración de antígeno presente en la muestra y el tiempo de reacción antes del bloqueo.

VII.4.5.3.INTERLEUCINA 10 (IL-10):

Citocina producida por los macrófagos activados y por ciertas células T colaboradoras cuya principal función es inhibir a los macrófagos activados, y por lo tanto mantener el control homeostático de las reacciones inmunitarias innata y humoral.

El anticuerpo IL-10 se une a un antígeno IL-10 (muestra), otro sitio del anticuerpo se une a un anticuerpo marcado específico para epitopos del antígeno. La enzima estreptavidina-peroxidasa se encuentra unida covalentemente al anticuerpo catalizando la formación de O_2 y H_2O a partir de H_2O_2 . El oxígeno reacciona con el cromógeno tetrametilbenzidina dando una coloración amarilla, la cual absorbe a una longitud de onda de 450 nm. La reacción catalítica va a ser dependiente de la concentración de antígeno presente en la muestra y el tiempo de reacción antes del bloqueo.

VII.4.5.4.INTERFERÓN GAMA (INF- γ):

Citocina producida por los linfocitos T y las células citocidas naturales (NK) cuya principal función consiste en activar a los macrófagos en las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas.

El antígeno INF- γ se une a un anticuerpo monoclonal específico (AME) para INF- γ seguido de la unión de un segundo anticuerpo marcado específico para epitopos no

solapados del antígeno. La enzima estreptavidina-peroxidasa se encuentra unida covalentemente al anticuerpo catalizando la formación de O_2 y H_2O a partir de H_2O_2 . El oxígeno reacciona con el cromógeno tetrametilbenzidina dando una coloración amarilla, la cual absorbe a una longitud de onda de 450 nm. La reacción catalítica va a ser dependiente de la concentración de antígeno presente en la muestra y el tiempo de reacción antes del bloqueo.

VII.4.5.5.FACTOR DE NECROSIS TUMORL (TNF- α):

Citocina pro-inflamatoria producida por la mayoría de las células nucleadas, pero principalmente por fagocitosis mononucleares activado (monocitos y linfocitos) que actúan estimulando el reclutamiento de los neutrófilos y monocitos a los sitios de infección. Estimula a las células del endotelio vascular para que expresen nuevas moléculas de adhesión, induce la secreción de quimioquinas por los macrófagos y las células endoteliales y promueve la apoptosis de las células diana. En las infecciones graves el TNF- α se produce en elevadas concentraciones y tiene efectos sistémicos, tales como la inducción de fiebre, síntesis de proteínas de fase aguda por el hígado. La producción de cantidades muy elevadas de TNF- α puede causar trombosis intravascular y shock. TNF- α , IL-1 e IL-6 son los mediadores de los procesos inflamatorios de la fase aguda. Una vez instalados los neutrófilos y macrófagos en los sitios de infección, secretan citocinas pro-inflamatorias que desencadenan la producción de proteínas de fase aguda por el hígado.

El antígeno TNF- α se une a un anticuerpo monoclonal específico (AME) para TNF- α seguido de la unión de un segundo anticuerpo marcado específico para epitopos no solapados del antígeno. La enzima estreptavidina-peroxidasa se encuentra unida covalentemente al anticuerpo catalizando la formación de O_2 y H_2O a partir de H_2O_2 . El oxígeno reacciona con el cromógeno tetrametilbenzidina dando una coloración amarilla, la cual absorbe a una longitud de onda de 450 nm. La reacción catalítica va a ser dependiente de la concentración de antígeno presente en la muestra y el tiempo de reacción antes del bloqueo.

VII.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Analizar estadísticamente los resultados obtenidos con las pruebas de correlación lineal, análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y tukey-kramer utilizando el software graph pad prisma 6.0. Utilizar un nivel de confianza del 95% ($P \leq 0.05$) para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.



VIII. RESULTADOS

VIII.1. NANO-MATERIALES

Dentro del laboratorio se sintetizó TiO_2 nano-métrico empleando las mismas variables de reacción empleadas para la síntesis de $\text{TiO}_2\text{-M}^+$ a través de un proceso sol gel. Los materiales se muestran en la figura 9 donde se observa que, al aumentar el dopaje aumenta la intensidad de color, debido a la foto-sensibilidad bajo luz visible. TiO_2 dopado con hierro mostró un color café claro, mientras que con plata el color va de un gris claro (Ag 1%) a un gris oscuro. Las actividades foto-catalíticas de dicho material, se evaluaron en contra de TiO_2 Sigma-Aldrich.

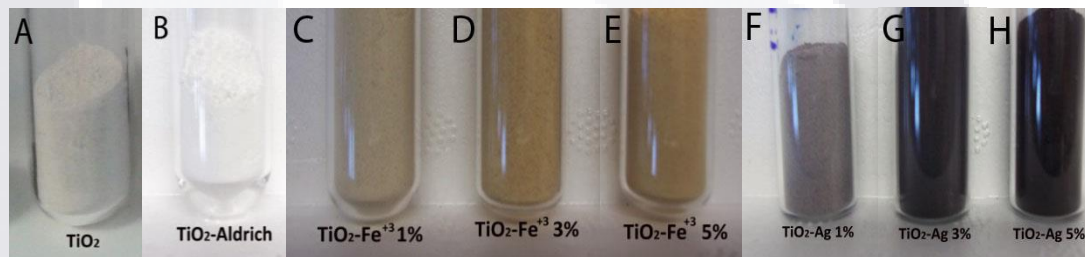


Figura 9. Nano-materiales: A. TiO_2 , B. $\text{TiO}_2\text{-Aldrich}$, C. $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 1%, D. $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 3%, E. $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 5%, F. $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 0.5%, G. $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 1.5% y H. $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 2.5%

VIII.2. CARACTERIZACIÓN

La caracterización de nano-materiales se llevó a cabo empleando técnicas espectroscópicas (UV-Visible, Raman, UV-Visible reflectancia difusa), difracción de rayos X, microscopia de electrones (SEM, TEM, EDX) y dispersión de luz dinámica (zetametro). Las nano-partículas de $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ presentaron un tamaño de 10 nm con forma esférica (Fig.10-A) así como los máximos de absorción de cada elemento (Ti, O y Fe) tras la caracterización por EDX-TEM (Fig 10-B). En la tabla se presentan los valores de ancho de banda prohibida (E_g) del catalizador TiO_2 (3.08 eV) y la disminución de E_g al aumentar el dopaje con Fe^{+3} .

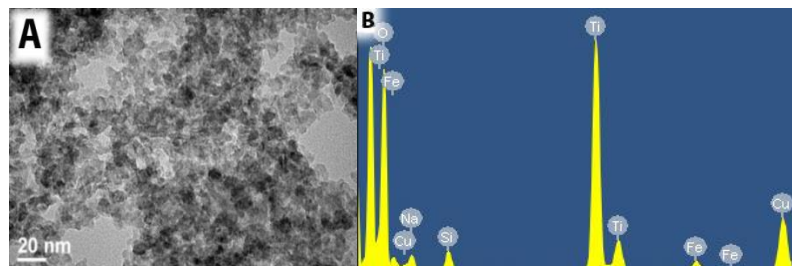


Figura 10. Caracterización de nano-partículas. A. $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ NPs por TEM; B. Análisis de elementos de $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ NPs por espectrofotometría de energía dispersiva (EDX).

Tabla 4: Ancho de Banda prohibida de los nano-materiales TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$

Catalizador	E_g	$\lambda(\text{nm})$
TiO_2	3.08	402.6
$\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 1%	2.71	457.56
$\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 3%	2.47	502.02
$\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 5%	2.26	548.67

La figura 11 muestra el análisis por SEM de nano-partículas de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ a diferentes dopajes 0.5% (Fig. 11-A), 1.5% (Fig. 11-B) y 2.5 % (Fig. 11-C) presentando NPs de forma esférica con un tamaño de ~10 nm. El análisis por difracción de rayos-X (XRD) de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 0.5% (Fig.12-A) mostró que la fase del material es anatasa presentando los espectros característicos en la escala 2θ (25.3° , 38.3° , 48.2° , 55.0° y 64.7°). En cambio, en los NMs $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 1.5% y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 2.5% la cristalinidad del material se vio afectada al incrementar el dopaje con plata, observándose los espectros ligeramente más agudos y con menor cristalinidad que señalan el carácter amorfo de la titanía. De la misma manera, TiO_2 se distribuye sólo en la superficie de Ag (Ahmed et al, 2013; Pugazhenthiran et al, 2013; Pan Xubin et al, 2010).

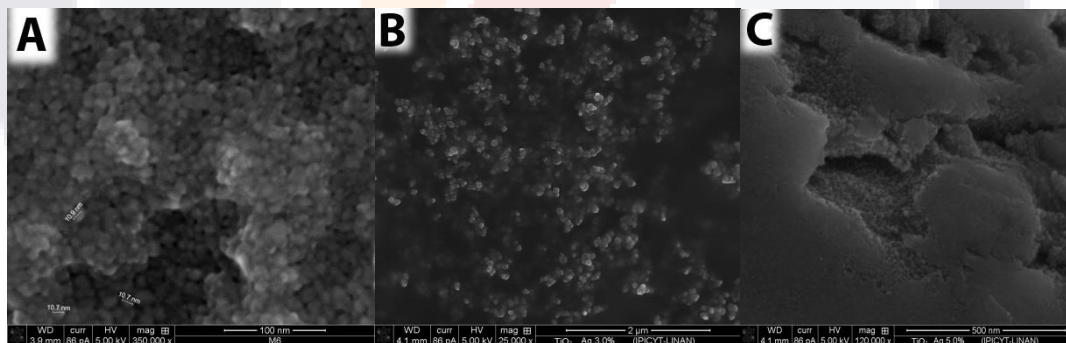


Figura 11: Caracterización de Nano-partículas por SEM A. $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 0.5%, B. $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 1.5% y C. $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 2.5%

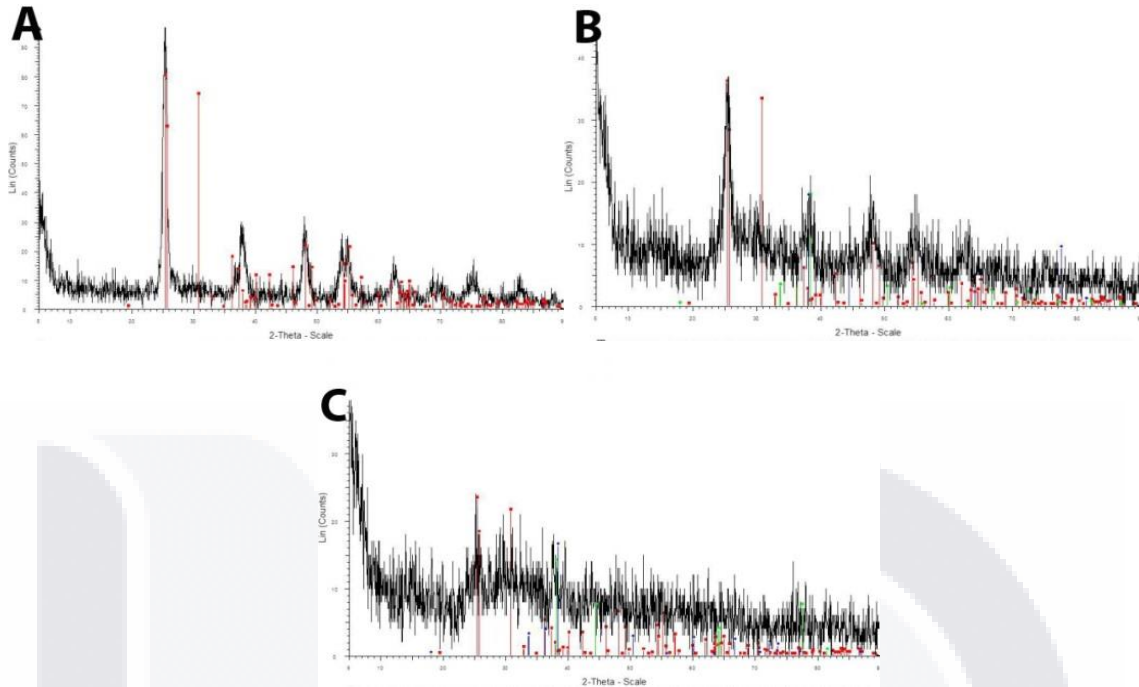


Figura 12: Caracterización de Nano-partículas por XRD: A. $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 0.5%, B. $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 1.5% C. $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 2.5%. Se observa que al incrementar el dopaje con plata, el TiO_2 es amorfo.

La estabilidad y agregación de las diferentes nano-partículas, se realizó a través de la evaluación del potencial zeta y del radio hidrodinámico. Las nano-partículas se suspendieron en solución salina fisiológica debido a que fue el medio utilizado para las diferentes pruebas *in vitro* así como la administración de las nano-partículas *in vivo*. En la tabla 5 se observa el incremento considerable en el tamaño de todos los nano-materiales respecto al tamaño original de la nano-partícula así como un aumento de entre el 40 y 50% en solución salina fisiológica respecto al observado en agua desionizada. Al comparar el radio hidrodinámico entre los diferentes nano-materiales, no se observó una diferencia considerable entre ellos. Los valores de potencial zeta para $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 1%, $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 1.5% y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 2.5%, fueron de $\sim +5.5$ mV indicando la inestabilidad de estas nano-partículas en solución salina fisiológica, mientras que los demás nano-materiales presentaron valores $> +40$ mV (figura 13). Todos los NMs presentaron carga positiva.

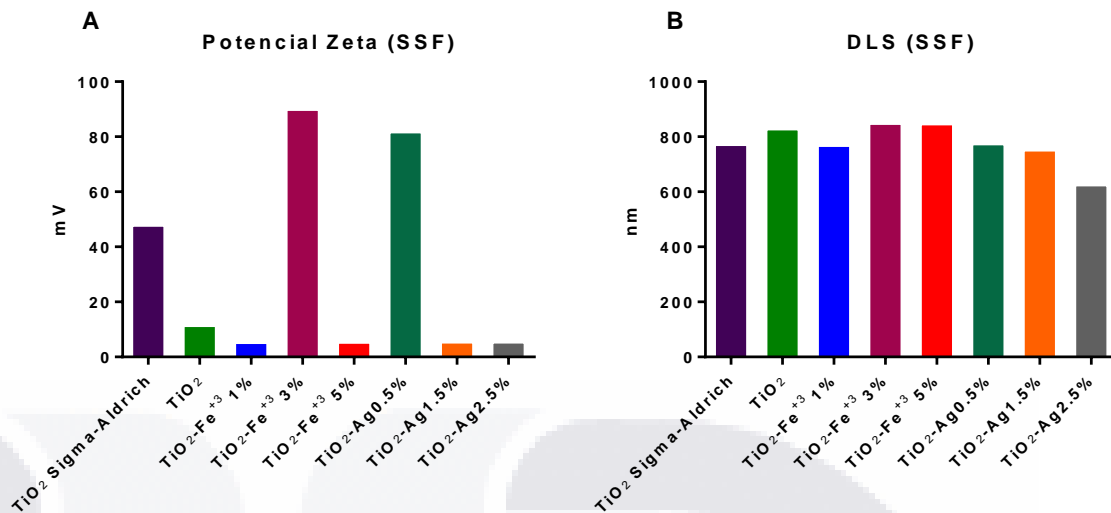


Figura 13: Determinación de potencial zeta (gráfica A) y radio hidrodinámico (Gráfica B) en solución salina fisiológica (SSF) a temperatura ambiente.

Tabla 5: Determinación de potencial zeta y radio hidrodinámico

Nano-material	Agua desionizada		Solución Salina Fisiológica	
	radio hidrodinámico	Potencial zeta	radio hidrodinámico	Potencial Zeta
TiO ₂ Sigma-Aldrich	477 nm	+10.39 mV	774 nm	+48.01 mV
TiO ₂	510 nm	- 30.58 mV	830 nm	+11.62 mV
TiO ₂ -Fe ⁺³ 1%	485 nm	+12.88 mV	770 nm	+5.47 mV
TiO ₂ -Fe ⁺³ 3%	382 nm	-26.82 mV	850 nm	+90.14 mV
TiO ₂ -Fe ⁺³ 5%	568 nm	-17.75 mV	849 nm	+5.54 mV
TiO ₂ -Ag 0.5%	467 nm	-27.83 mV	776 nm	+81.94 mV
TiO ₂ -Ag 1.5%	636 nm	+33.14 mV	754 nm	+5.64 mV
TiO ₂ -Ag 2.5%	486 nm	+28.51 mV	627 nm	+5.64 mV

VIII.3. PRUEBAS IN VITRO

VIII.3.1. PRUEBA DE HEMÓLISIS (CUALITATIVA)

La determinación cualitativa de hemólisis se llevó a cabo en 8 materiales TiO₂, TiO₂ Sigma-Aldrich, TiO₂-Fe⁺ 1% TiO₂-Fe 3%, TiO₂-Fe 5%, TiO₂-Ag 0.5%, TiO₂-Ag 1.5%, TiO₂-Ag 2.5% en diferentes condiciones: luz (luz visible y oscuridad), temperatura (24°C y 37°C) y muestra biológica (eritrocitos lavados y sangre completa).

El grado de hemólisis se determinó a las 24 horas a 24°C y 12 horas a 37°C (véase ANEXO). Respecto a los materiales TiO₂, TiO₂ Sigma-Aldrich y TiO₂-Fe⁺³ (Figura 14, 15, 16, 17 y 18) no se observan diferencias en el grado de hemólisis respecto al control negativo. Al contrario, los materiales dopados con Ag a diferentes porcentajes (0.5, 1.5 y 2.5) presentan un grado de hemólisis significativo respecto al control negativo (Fig. 19, 20 y 21). En general, respecto al tipo de muestra utilizada, las variables utilizando Sangre Completa (C,D,G Y H) presentaron menor grado de hemólisis que al utilizar eritrocitos lavados (A,B,E Y F).

TiO₂-NPs

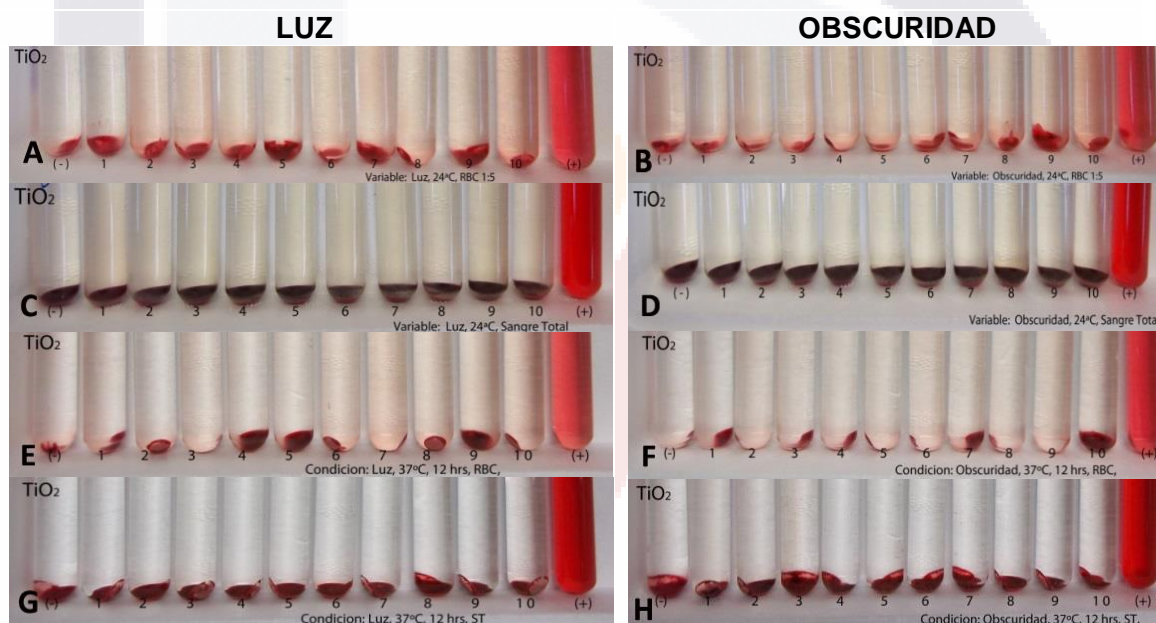


Figura 14: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO₂ a concentraciones 0.1 a 1.0 mg/mL en diferentes condiciones: **A** Luz, 24°C, RBC; **B** Oscuridad, 24°C, RBC; **C** Luz, 24°C, Sangre Completa; **D** Oscuridad, 24°C, Sangre Completa; **E** Luz, 37°C, RBC; **F** Oscuridad, 37°C, RBC; **G** Luz, 37°C, Sangre Completa; **H** Luz, 24°C, RBC;

TiO₂ -NPs Sigma-Aldrich

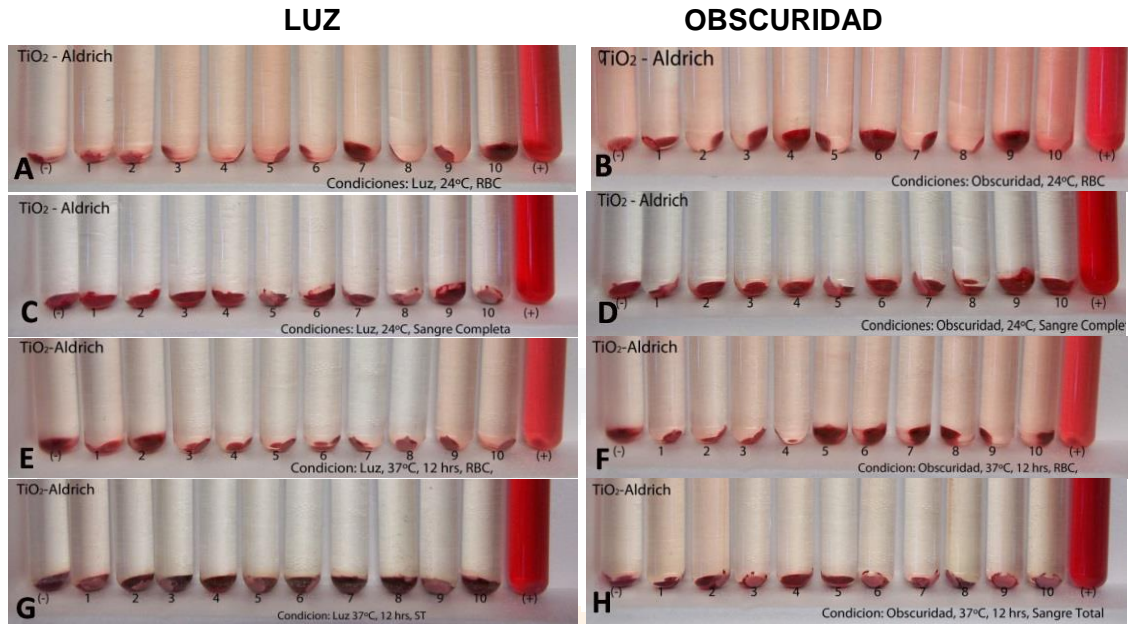


Figura 15: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO₂-Sigma-Aldrich a concentraciones 1.0 a 1.0 mg/mL en diferentes condiciones: **A** Luz, 24°C, RBC; **B** Obscuridad, 24°C, RBC; **C** Luz, 24°C, Sangre Completa; **D** Obscuridad, 24°C, Sangre Completa; **E** Luz, 37°C, RBC; **F** Obscuridad, 37°C, RBC; **G** Luz, 37°C, Sangre Completa; **H** Luz, 24°C, RBC

TiO₂ -Fe⁺³ 1%

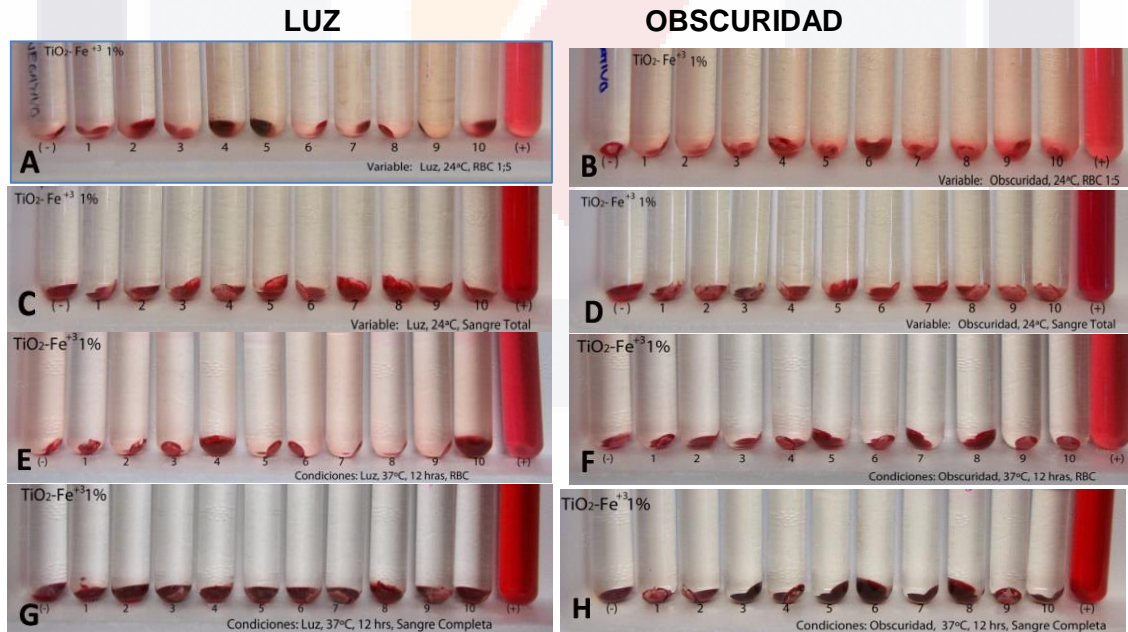


Figura 16: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO₂-Fe⁺³ 1% a concentraciones 0.1 a 1.0 mg/mL en diferentes condiciones: **A** Luz, 24°C, RBC; **B** Obscuridad, 24°C, RBC; **C** Luz, 24°C, Sangre Completa; **D** Obscuridad, 24°C, Sangre Completa; **E** Luz, 37°C, RBC; **F** Obscuridad, 37°C, RBC; **G** Luz, 37°C, Sangre Completa; **H** Luz, 24°C, RBC;

TiO₂ -Fe⁺³ 3%

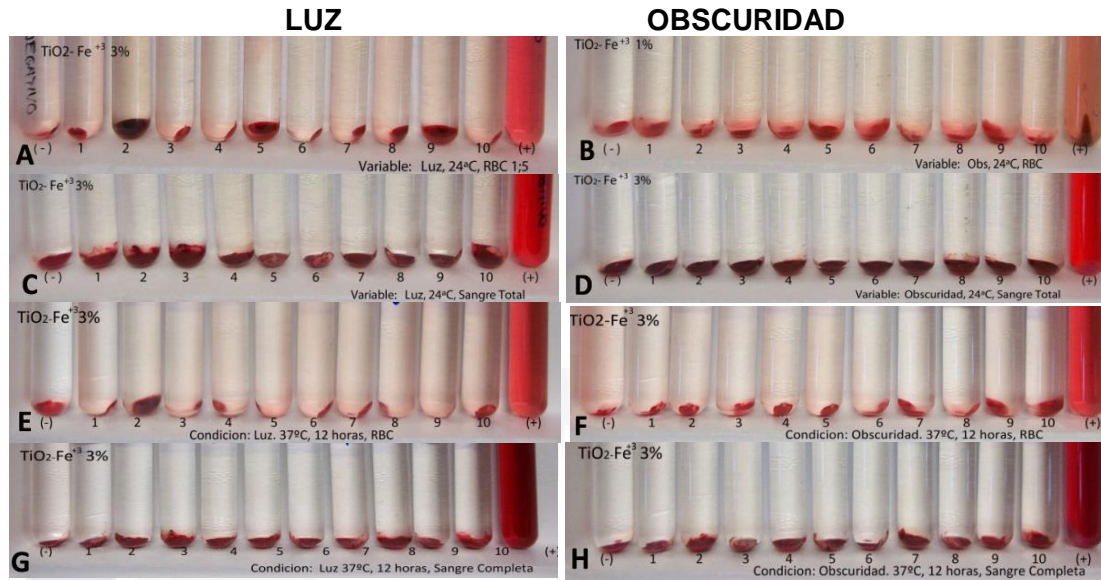


Figura 17: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO₂-Fe⁺³ 3% a concentraciones 1.0 a 1.0 mg/mL en diferentes condiciones: **A** Luz, 24°C, RBC; **B** Obscuridad, 24°C, RBC; **C** Luz, 24°C, Sangre Completa; **D** Obscuridad, 24°C, Sangre Completa; **E** Luz, 37°C, RBC; **F** Obscuridad, 37°C, RBC; **G** Luz, 37°C, Sangre Completa; **H** Luz, 24°C, RBC;

TiO₂ -Fe⁺³ 5%

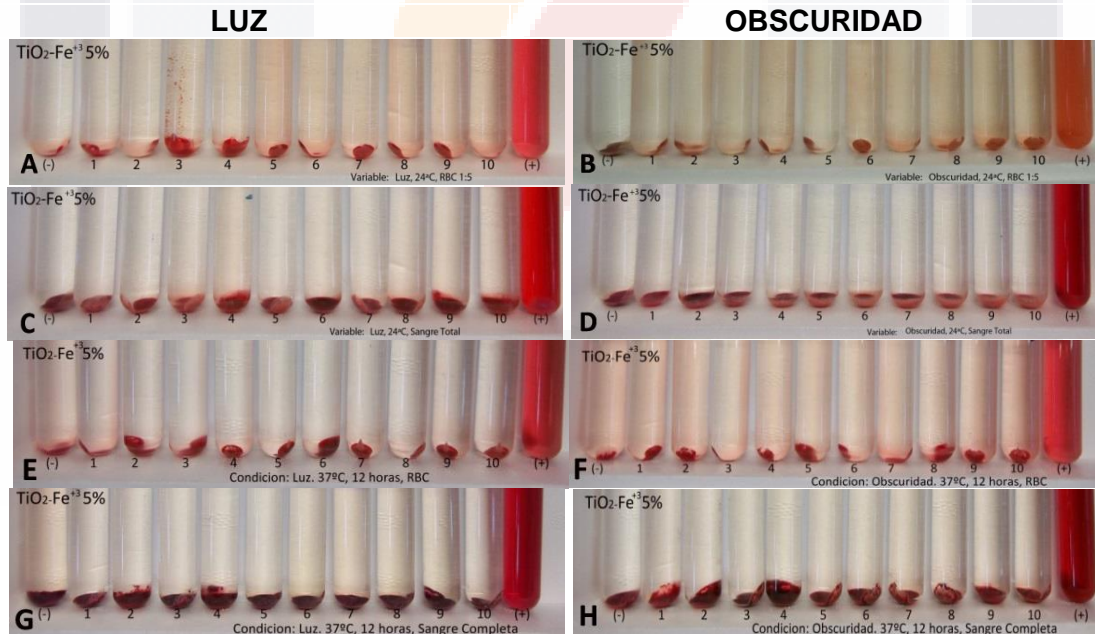


Figura 18: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO₂-Fe⁺³ 5% a concentraciones 0.1 a 1.0 mg/mL en diferentes condiciones: **A** Luz, 24°C, RBC; **B** Obscuridad, 24°C, RBC; **C** Luz, 24°C, Sangre Completa; **D** Obscuridad, 24°C, Sangre Completa; **E** Luz, 37°C, RBC; **F** Obscuridad, 37°C, RBC; **G** Luz, 37°C, Sangre Completa; **H** Luz, 24°C, RBC;

TiO₂ –Ag 0.5%

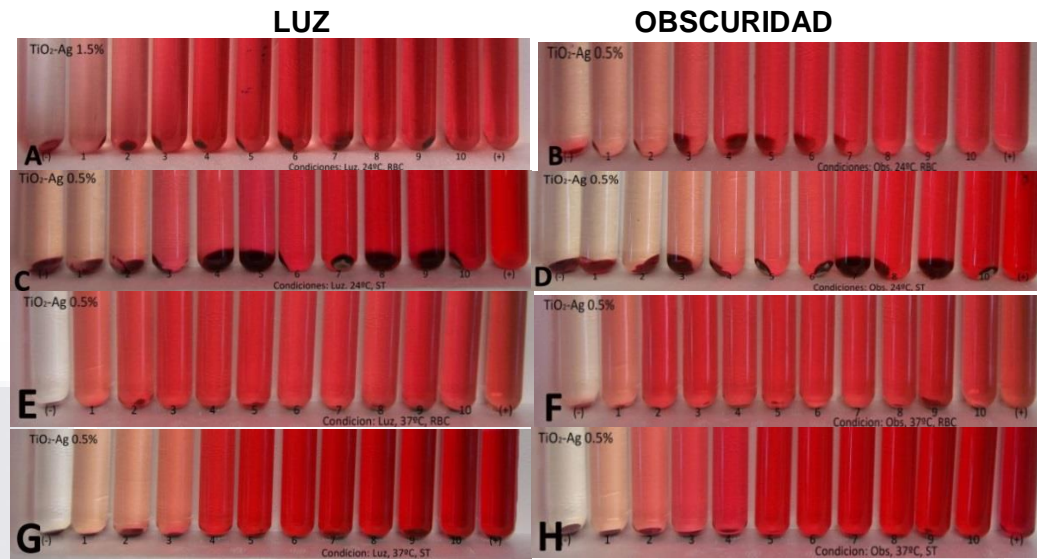


Figura 19: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO₂- Ag 0.5% a concentraciones 0.1 a 1.0 mg/mL en diferentes condiciones: **A** Luz, 24°C, RBC; **B** Obscuridad, 24°C, RBC; **C** Luz, 24°C, Sangre Completa; **D** Obscuridad, 24°C, Sangre Completa; **E** Luz, 37°C, RBC; **F** Obscuridad, 37°C, RBC; **G** Luz, 37°C, Sangre Completa; **H** Luz, 24°C, RBC;

TiO₂ –Ag 1.5%

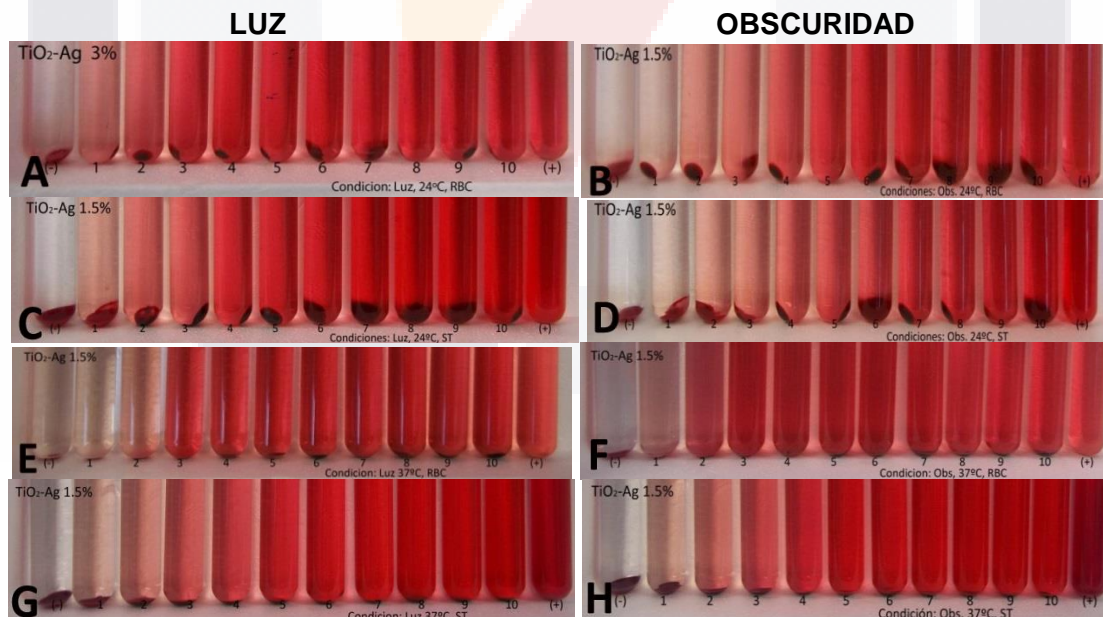


Figura 20: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO₂-Ag 1.5% a concentraciones 0.1 a 1.0 mg/mL en diferentes condiciones: **A** Luz, 24°C, RBC; **B** Obscuridad, 24°C, RBC; **C** Luz, 24°C, Sangre Completa; **D** Obscuridad, 24°C, Sangre Completa; **E** Luz, 37°C, RBC; **F** Obscuridad, 37°C, RBC; **G** Luz, 37°C, Sangre Completa; **H** Luz, 24°C, RBC;

TiO₂ -Ag 2.5%

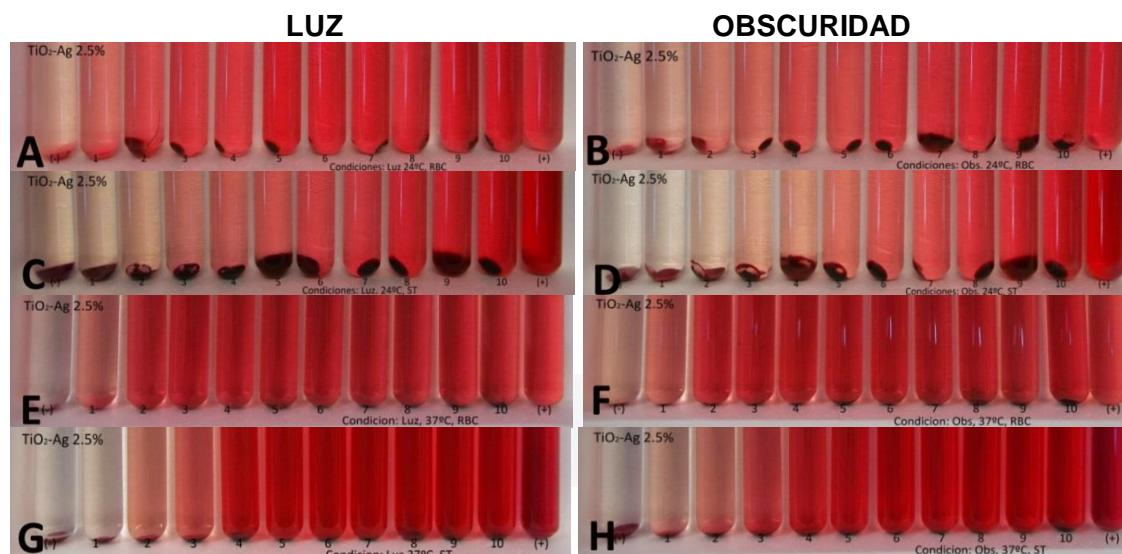


Figura 21: Determinación de la hemólisis cualitativa producida por el TiO₂-Ag 2.5% a concentraciones 0.1 a 1.0 mg/mL en diferentes condiciones: **A** Luz, 24°C, RBC; **B** Oscuridad, 24°C, RBC; **C** Luz, 24°C, Sangre Completa; **D** Oscuridad, 24°C, Sangre Completa; **E** Luz, 37°C, RBC; **F** Oscuridad, 37°C, RBC; **G** Luz, 37°C, Sangre Completa; **H** Luz, 24°C, RBC;

VIII.3.2. ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

La actividad hemolítica del TiO₂, se evaluó en contra de TiO₂ Sigma-Aldrich. Los resultados obtenidos muestran que TiO₂ Sigma-Aldrich presenta una mayor actividad hemolítica (mayor actividad foto-catalítica) que TiO₂ sintetizado en el laboratorio (figura 22), siendo la variable a temperatura ambiente (figura 22-A) significativamente diferente a 37°C (Fig. 22-B).

Los resultados de la actividad hemolítica de los nano-materiales TiO₂-Fe⁺³ muestran el mismo comportamiento que TiO₂-NP ya que no presentaron actividad hemolítica al utilizar sangre completa. En las figura 23 se puede observar el comportamiento de los materiales que producen hemólisis en cada una de las variables analizadas. Al utilizar el dopaje con Fe⁺³ al 1%, 3% o 5% en las mismas condiciones a 24°C no hay diferencia significativa (23-A), mientras que a 37°C (Fig. 23-B) si existe una diferencia significativa entre los tres dopajes (**p<0.05). Bajo condiciones de temperatura ambiente los materiales a todos los dopajes de hierro presentaron hemólisis con RBC (Fig. 23-A).

En el caso del nano-material de TiO₂ -Ag se dopó con tres diferentes porcentajes de Plata: 0.5% (Fig. 24-A y 24-B), 1.5% (Fig. 24-C y 24-D) y 2.5% (Fig. 24-E y 24-F).

En los tres porcentajes de dopaje y en todas las variables analizadas se presentó hemólisis aun en bajas concentraciones, llegando a ser de hasta el 100% en concentraciones de 0.1 mg/mL. Respecto al $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 2.5%, los resultados muestran una menor respuesta de daño tras la exposición de los eritrocitos al NM con respecto a los dopajes de 0.5% y 1.5% con plata. En cuestión de la temperatura, los eritrocitos presentaron mayor lisis a 37°C que a 24°C.

Al analizar cada una de las variables empleadas con respecto a los diferentes NMs se puede observar una curva característica de dosis-respuesta, en dónde a mayor concentración del nano-material existe un mayor daño sobre las células rojas sanguínea (figuras 22, 23 y 24).

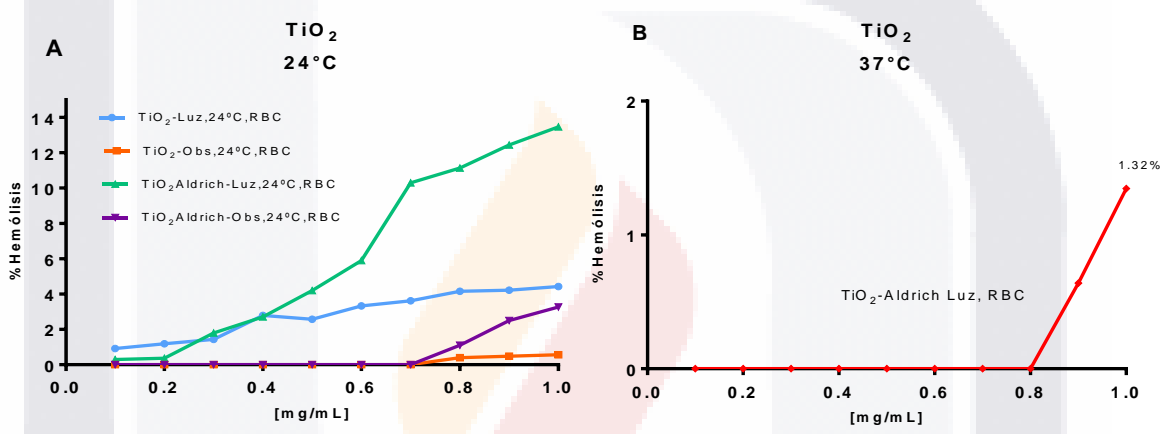


Figura 22: Determinación de la actividad hemolítica *in vitro* a concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/mL de **A.** TiO_2 (24°C) y **B.** TiO_2 (37°C). Curva dosis-respuesta. Los datos representan la media \pm S.E.M (n = 3)

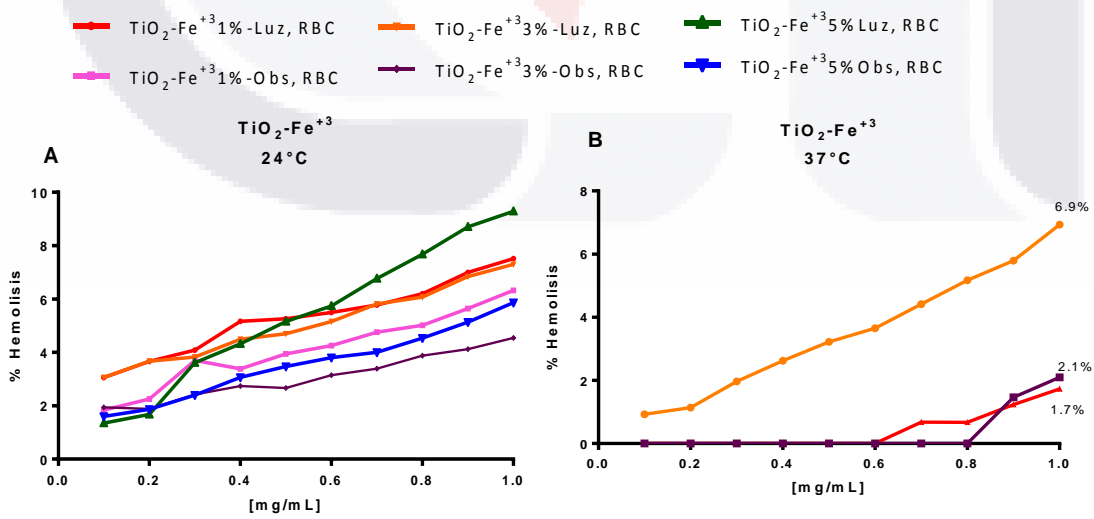


Figura 23: Determinación de la actividad hemolítica *in vitro* a concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/mL de **A.** $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ (24°C), **B.** $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ (37°C). Curva dosis-respuesta. Los datos representan la media \pm S.E.M (n = 3)

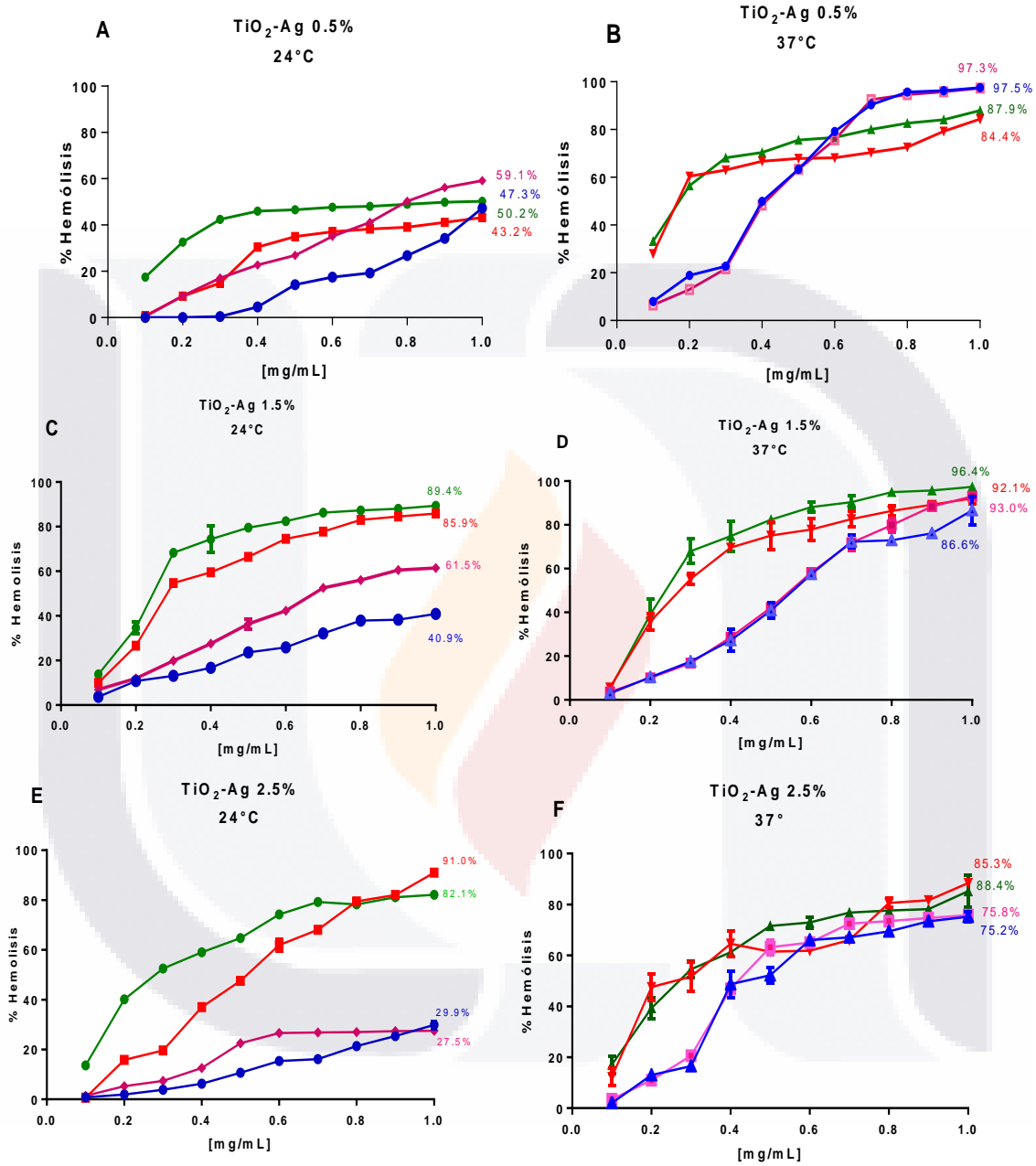


Figura 24: Determinación de la actividad hemolítica *in vitro* a concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/mL de **A.** TiO₂-Ag 0.5% (24°C), **B.** TiO₂-Ag 0.5% (37°C), **C.** TiO₂-Ag 1.5% (24°C), **D.** TiO₂-Ag 1.5% (37°C), **E.** TiO₂-Ag 2.5% (24°C), **F.** TiO₂-Ag 2.5% (34°C). Curva dosis-respuesta. Los datos representan la media ± S.E.M (n = 3)

VIII.3.3. Materiales seguros No Hemolíticos.

Respecto a la seguridad de los nano-materiales, la ASTM-F 756-08 (Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials) considera como materiales seguros no hemolíticos aquellos que presenten un porcentaje de actividad hemolítica menor de 2% en RBC a 37°C. Los valores se muestran en la tabla 6 donde se observa que TiO₂ y TiO₂-Fe⁺³ necesitan una concentración mayor de 1.0 mg/mL para ocasionar el 2% de hemólisis mientras que TiO₂-Ag ejerce esta acción a concentraciones menores del 1.0 mg/mL.

Tabla 6: Concentración en mg/mL de los NMs TiO₂, TiO₂-Sigma-Aldrich, TiO₂-Fe⁺³ y TiO₂-Ag que causa el 2% de lisis de los eritrocitos.

NPs	RBC				SC			
	24°C		37°C		24°C		37°C	
	Luz	Obs	Luz	Obs	Luz	Obs	Luz	Obs
TiO ₂	0.34	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
TiO ₂ - Sigma-Aldrich	0.29	0.98	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
TiO ₂ -Fe ⁺³ 1%	<0.1	<1	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
TiO ₂ -Fe ⁺³ 3%	<0.1	0.19	0.31	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
TiO ₂ -Fe ⁺³ 5%	0.17	0.21	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
TiO ₂ -Ag 0.5%	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.27	<0.1	<0.1
TiO ₂ -Ag 1.5%	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.12	0.10
TiO ₂ -Ag 2.5%	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.12	<0.1	<0.1

>1.0 representa la concentración que ocasiona el 2% de lisis mayor a 1.0 mg/mL. <0.1 representa la concentración que ocasiona el 2% de lisis menor a 0.1 mg/mL. Los datos representan la media ± S.E.M (n = 3)

VIII.3.4. Análisis comparativo de los NMs (1.0 mg/mL)

En general, se puede observar en la figura 24 que al utilizar sangre completa hay una disminución importante en el daño de las células rojas respecto a los eritrocitos lavados. El material que causó mayor actividad hemolítica fue TiO₂-Ag mientras que, en general, la condición “RBC a 24°C” muestra ser la variable más susceptible a que los eritrocitos presenten hemólisis bajo la interacción con los NMs bajo estudio.

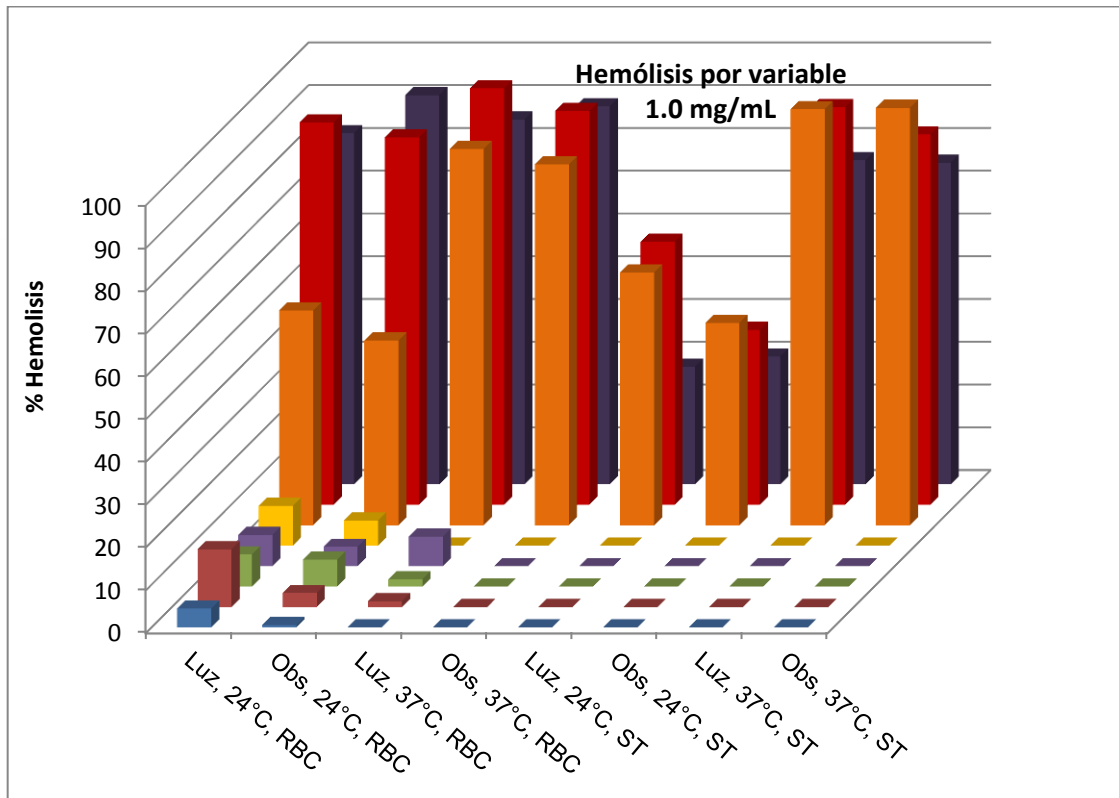
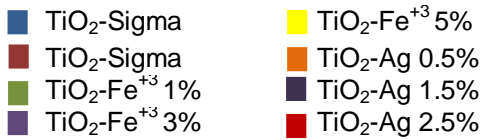


Figura 25. Porcentaje de hemólisis a una concentración de 1.0 mg/mL de los NMs TiO₂, TiO₂-Sigma-Aldrich, TiO₂-Fe⁺³ y TiO₂-Ag tras la exposición de los eritrocitos a las diferentes variables analizadas. Los datos representan la media ± S.E.M (n = 3)

VIII.3.5. TiO₂-Ag

Para poder comparar de una mejor manera entre los diferentes nano-materiales de TiO₂-Ag, en la figura 26 se presenta un análisis comparativo entre los tres dopajes con plata (0.5, 1.5 y 2.5) para cada variable. Respecto a las variables luz, 24°C, RBC (A); obscuridad, 24°C, RBC (B) y luz, 24°C, SC (E), existe diferencia significativa (*p<0.05) entre el dopaje a 0.5 y 1.5, mientras que para las demás variables no existe una diferencia significativa. Las gráficas E y F (Fig. 26), presentan las variables con menor actividad hemolítica de los materiales de plata evaluados (obscuridad o luz a 24° C utilizando sangre completa). Al comparar las gráficas con la misma condición de temperatura y muestra, podemos observar la misma tendencia entre luz y obscuridad. A excepción de la variable a 37°C utilizando sangre completa (Fig. 26-G y 26-H), el material que presentó mayor actividad hemolítica fue TiO₂-Ag 1.5%

- TiO₂-Ag 0.5%
- TiO₂-Ag 1.5%
- ▲ TiO₂-Ag 2.5%

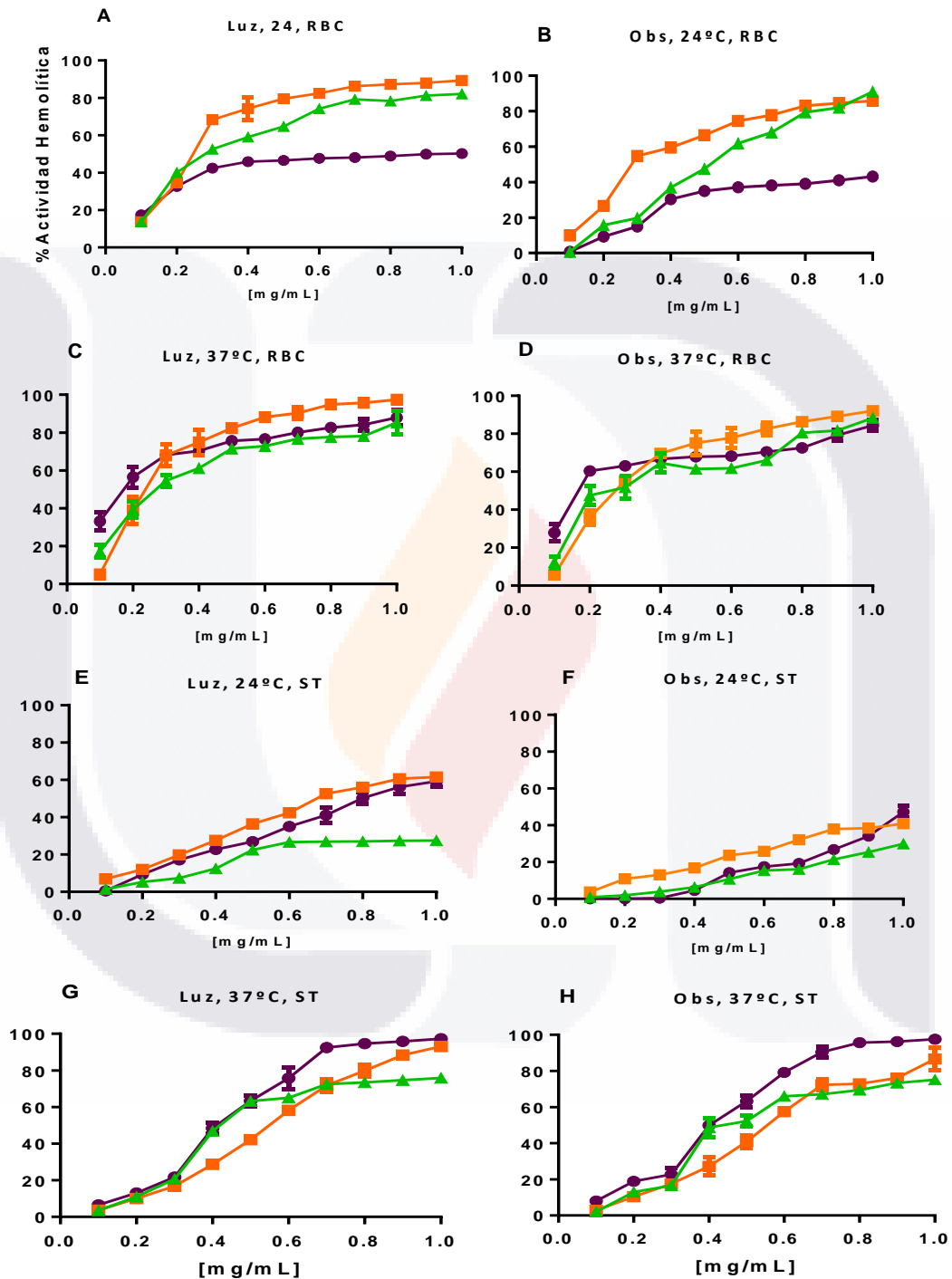


Figura 26: Comparación de la actividad hemolítica de los diferentes materiales de TiO₂-Ag (0.5, 1.5 y 2.5 Ti/Ag mol%) bajo las diferentes condiciones de estudio: **A.** luz a 24°C con RBC (TiO₂-Ag 0.5% *p< 0.05 comparado TiO₂-Ag 1.5%); **B.** Oscuridad a 24°C con RBC (TiO₂-Ag 0.5% *p< 0.05 comparado TiO₂-Ag 1.5%); **C.** luz a 37°C con RBC (p>0.05); **D.** oscuridad a 37°C con RBC (p>0.05); **E.** luz a 24°C con sangre completa (TiO₂-Ag 0.5% *p< 0.05 comparado TiO₂-Ag 1.5%); **F.** Oscuridad a 24°C con sangre completa

($p > 0.05$); **G.** luz a 37°C con sangre completa ($p > 0.05$); **H.** Oscuridad a 37°C con sangre completa ($p > 0.05$). Curva dosis-respuesta. Los datos representan la media \pm S.E.M (n = 3)

En la figura 27 se muestran las concentraciones de los nano-materiales de TiO₂-Ag en los tres diferentes dopajes que causan el 50% de lisis en las diferentes condiciones analizadas, observando que en general TiO₂-Ag 1.5% produce mayor hemólisis a menor concentración del material. La variable que requiere menor concentración para producir el 50% de hemólisis es a 37°C utilizando RBC, mientras que a 24°C en condiciones de oscuridad se requiere una mayor concentración para producir el 50% de hemólisis.

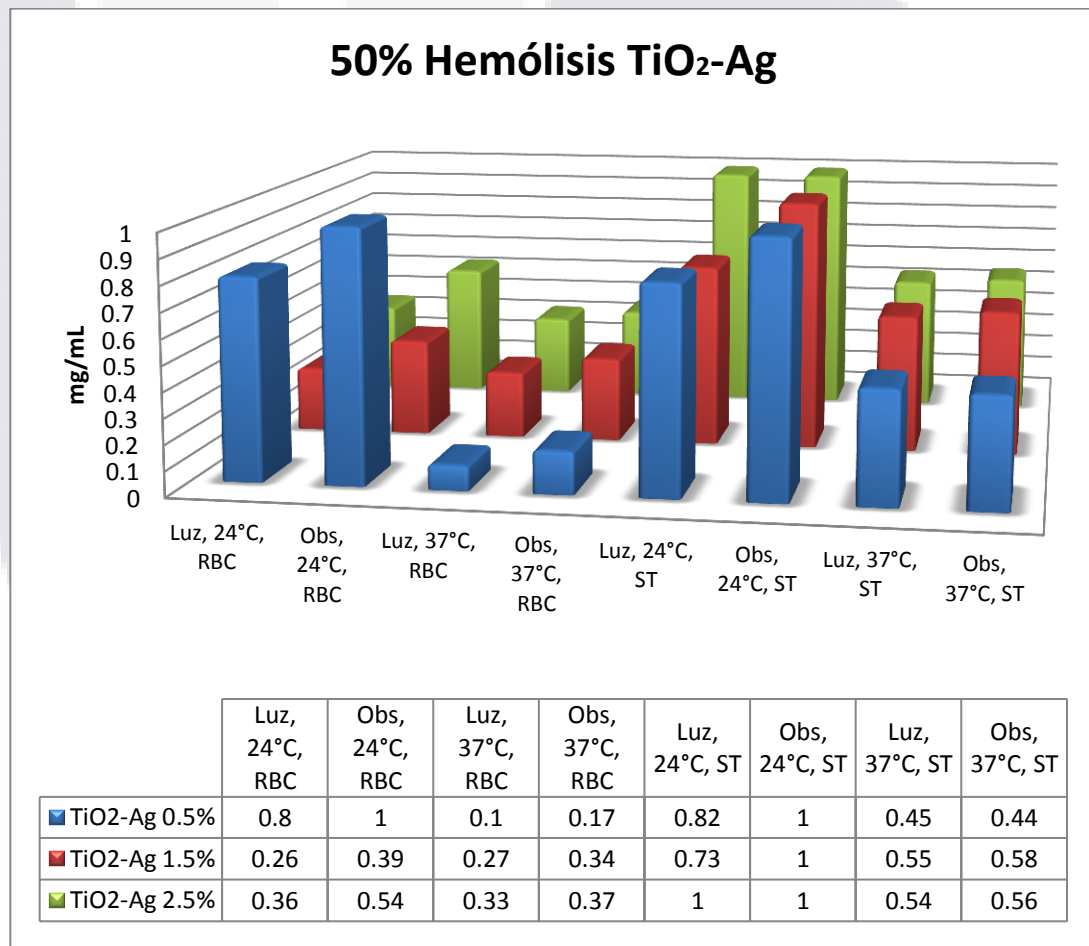


Figura 27: Concentración que ocasiona el 50% de lisis en las diferentes variables utilizando los diferentes materiales de TiO₂-Ag (0.5, 1.5 y 2.5 Ti/Ag mol%) a 37°C. (*) Representa la concentración de NM no conocida mayor de 1.0 mg/mL que causa el 50% de hemólisis. *1 representa la concentración que ocasiona el 50% de lisis no conocida mayor de 1.0 mg/ml. Los datos representan la media \pm S.E.M (n= 3)

VIII.3.6. CONCENTRACIÓN DE IONES EN SOLUCIÓN

VIII.3.6.1. Determinación de iones hierro en solución.

Los NMs de TiO_2-Fe^{+3} analizados no presentaron lixiviación de iones hierro (controles y variables).

VIII.3.6.2. Determinación de iones plata en solución

La determinación de iones en solución se realizó a través de espectrofotometría de absorción atómica y al porcentaje respecto a la plata total que se encuentra en el material. La tabla 7 muestra la concentración de plata que se encuentra en el nano-material respecto a la concentración de TiO_2-Ag y al dopaje.

Tabla 7: Concentración de plata total respecto a los mg/ml del nano-material en ppm

[Ag] en ppm Total en el Nano-material			
mg/mL	TiO_2-Ag 0.5%	TiO_2-Ag 1.5%	TiO_2-Ag 2.5%
0.2	0.131	0.393	0.634
0.4	0.262	0.787	1.269
0.6	0.393	1.18	1.903
0.8	0.524	1.573	2.538
1.0	0.655	1.967	3.172

Las gráficas A, C y D de la figura 28, representan los controles de plata liberada del material en solución salina en las diferentes condiciones de luz y temperatura sin presencia de eritrocitos. Al analizar los controles se observa un decremento en el porcentaje de plata liberada conforme aumenta la concentración del nano-material en la solución, así como una disminución considerable de plata liberada conforme aumenta el dopaje de este metal, siendo mayor a 37°C. Los nano-materiales de TiO_2-Ag en contacto con los eritrocitos, presentaron menor presencia de iones en solución respecto a los controles (Fig. 28-B, D y F).

En general, los materiales de TiO_2-Ag (0.5, 1.5 y 2.5 Ti/Ag mol%) en contacto con los eritrocitos presentaron el mismo comportamiento respecto a la lixiviación de iones en solución en: 1) No se observó diferencia al incubar en luz u oscuridad a la misma temperatura (a excepción de TiO_2-Ag 1.5% a 37°C); 2) Se presentó mayor lixiviación de iones Ag^+ a 24°C; 3) No se presentó diferencia a 37°C en las 4 diferentes variables, 4) a 24°C presentó mayor lixiviación en RBC que en sangre

completa y 5) se observó menor concentración de iones Ag^+ en presencia de eritrocitos a 37°C en comparación con los controles.

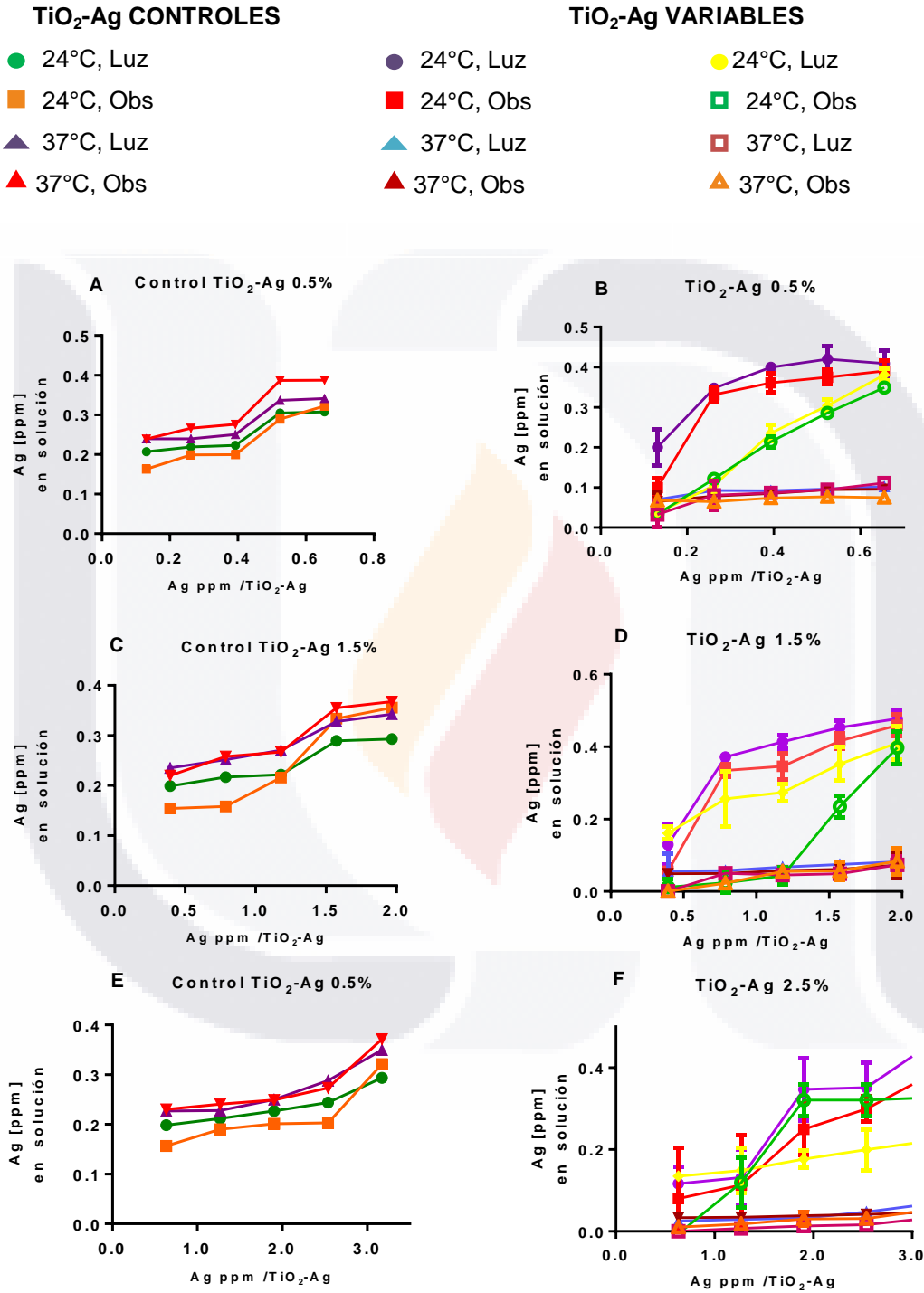


Figura 28: Evaluación del porcentaje de plata que sufre lixiviación del material TiO₂-Ag en SSF tras incubarla en las 4 diferentes condiciones (controles) y tras la exposición a los eritrocitos. **A.** Control TiO₂-Ag 0.5%, **B.** TiO₂-Ag 0.5%, **C.** Control TiO₂-Ag 1.5%, **D.** TiO₂-Ag 1.5%, **E.** Control TiO₂-Ag 2.5%, **F.** TiO₂-Ag 2.5%. Los datos representan la media ± S.E.M (n = 3)

VIII.3.7. CORRELACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA Y LA CONCENTRACIÓN DE IONES

Las figuras 29, 30 y 31, muestran la relación que existe entre la concentración de iones liberados en solución (ppm) respecto a la actividad hemolítica presentada en cada una de las variables. El modelo biológico presentó una correlación entre los iones lixiviados en solución y el daño a las células rojas de sangre humana. Así también se observa en las gráficas obtenidas (figuras 29, 30 y 31) que la actividad hemolítica en sangre completa es menor en cada una de las variables analizadas. Las gráficas muestran un comportamiento similar en condiciones de luz que de obscuridad a la misma temperatura.

TiO₂-Ag 0.5%

- RBC
- Sangre Completa

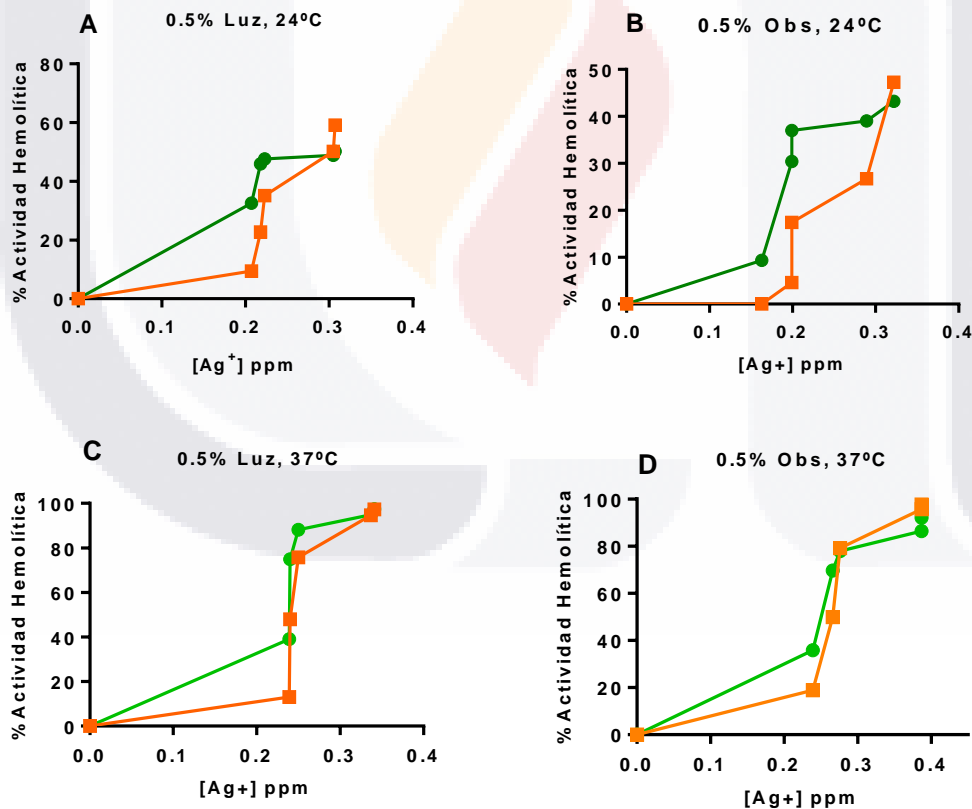


Figura 29: Correlación entre el porcentaje de la actividad hemolítica de nano-materiales de TiO₂-Ag 0.5% respecto a los iones Ag⁺ lixiviados en solución. **A.** Luz, 24°C RBC: R² = 0.91; ST: R² = 0.74, **B.** Obscuridad, 24°C, RBC: R² = 0.82; ST: R² = 0.66 **C.** Luz, 37°C, RBC: R² = 0.84; ST: R² = 0.70 **D.** Obscuridad, 37°C, RBC: R² = 0.90; ST: R² = 0.80. Los datos representan la media ± S.E.M (n = 3)

TiO₂-Ag 1.5%

- RBC
- Sangre Completa

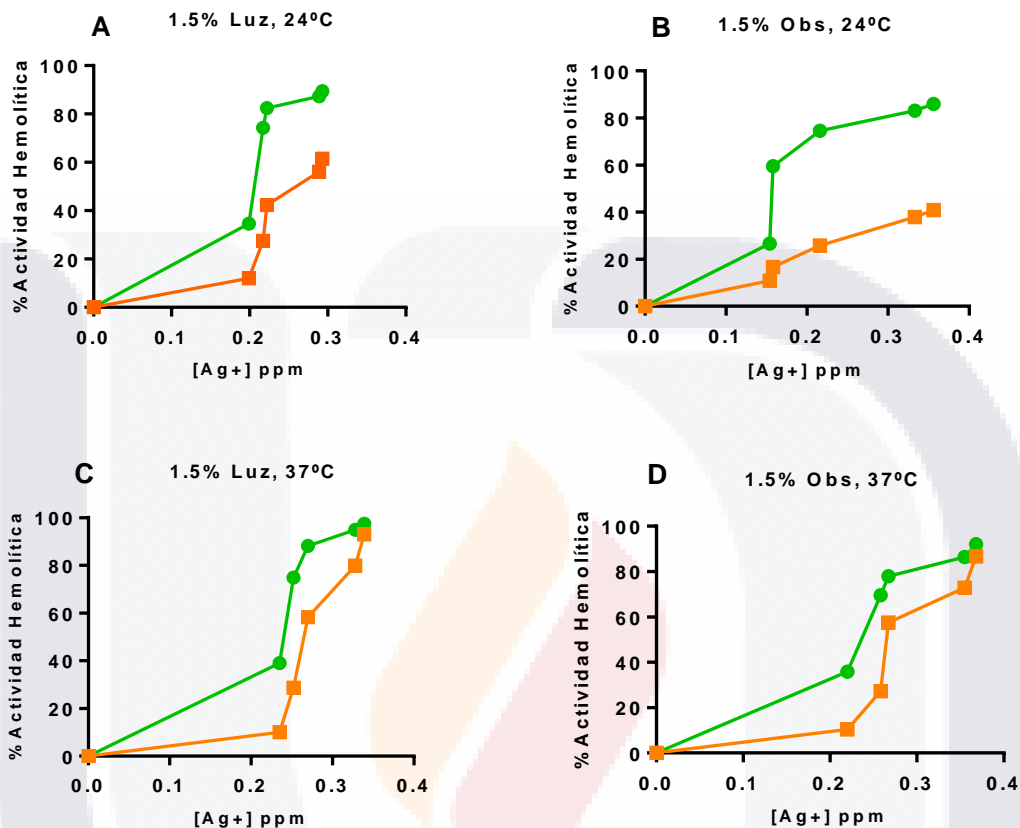


Figura 30: Correlación entre el porcentaje de la actividad hemolítica de nano-materiales de TiO₂-Ag 1.5% respecto a los iones Ag⁺ lixiviados en solución. **A.** Luz, 24°C RBC: R² = 0.85; ST: R²=0.76, **B.** Obscuridad, 24°C, RBC: R² = 0.86; ST: R² = 0.97 **C.** Luz, 37°C, RBC: R² = 0.88; ST: R²=0.70 **D.** Obscuridad, 37°C, RBC: R² = 0.92; ST: R²=0.74. Los datos representan la media ± S.E.M (n = 3)

TiO₂-Ag 2.5%

- RBC
- Sangre Completa

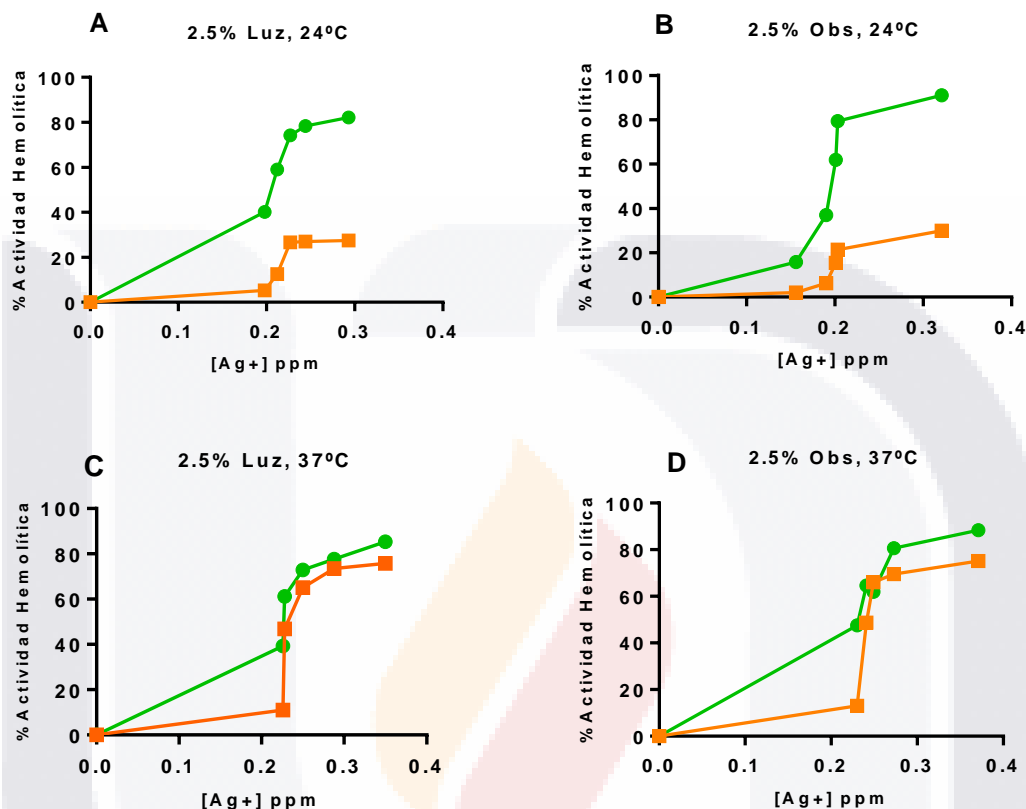


Figura 31: Correlación entre el porcentaje de la actividad hemolítica de nano-materiales de TiO₂-Ag 2.5% respecto a los iones Ag⁺ lixiviados en solución. **A.** Luz, 24°C RBC: R² = 0.91; ST: R² = 0.66. **B.** Obscuridad, 24°C, RBC: R² = 0.77; ST: R² = 0.71. **C.** Luz, 37°C, RBC: R² = 0.91; ST: R² = 0.70. **D.** Obscuridad, 37°C, RBC: R² = 0.94; ST: R² = 0.69. Los datos representan la media ± S.E.M (n = 3)

VIII.3.8. INTERACCIÓN DE LAS CELULAS ROJAS CON TiO₂-Ag

El análisis por SEM de las muestras biológicas se presenta en las figuras 32 y 33. En la fig. 32-A y 32-B se muestran los controles presentando una morfología normal, membrana intacta y su forma bicóncava característica. Por otro lado, tras la exposición a las NPs por 1 hora, se observó el rompimiento y daño a la membrana celular (figura

32-C y 32-D), eritrocitos hipotónicos (fig. 32-E) y deformación de la membrana celular (fig. 32-F).

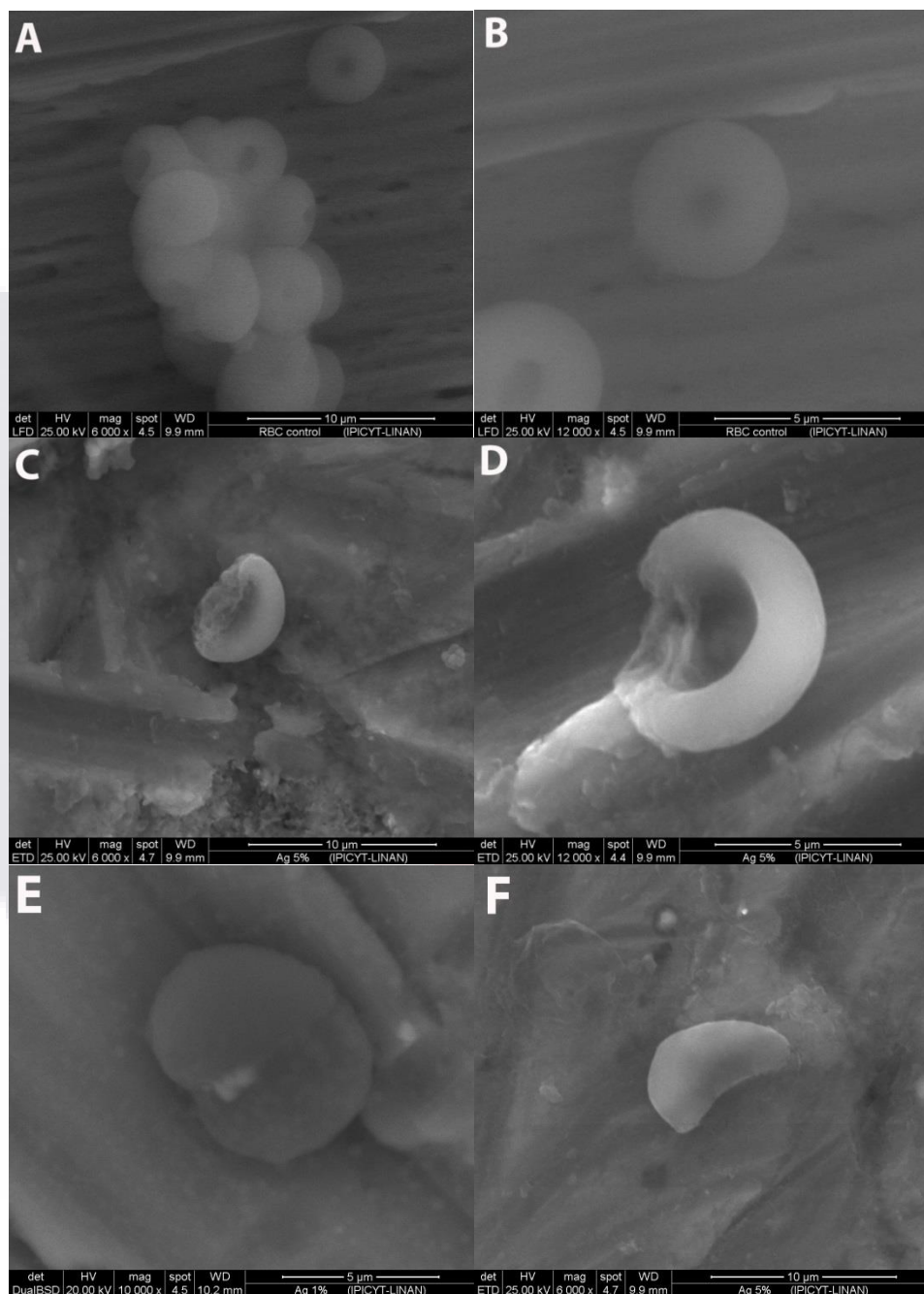


Figura 32. Daño de la membrana celular de las células rojas humanas tras la exposición a $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ a través de SEM donde A. y B. Control C., D., E y F Células rojas tras la exposición de 1 hora a 1.0 mg/mL $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 5%

En las figuras 33-A y 33-C se presenta el análisis del material tras su exposición a eritrocitos con $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 0.5% y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 1.5%. Se les realizó el análisis EDX-SEM para determinar los elementos presentes en ella, confirmando la presencia de Ag y no así de Ti u O (Fig. 33-B y 33-D).

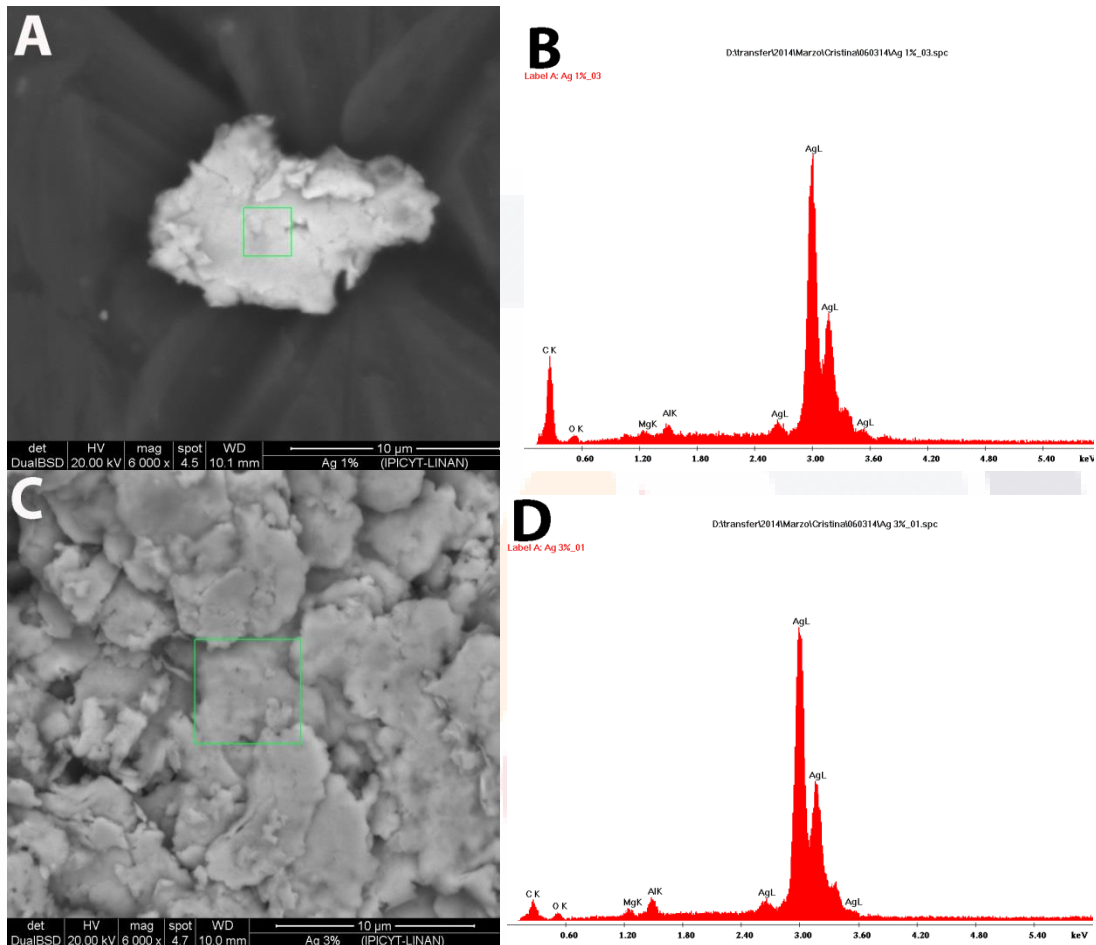


Figura 33. Análisis por SEM y EDX de material encontrado en la muestra tras la exposición de células rojas humanas con $\text{TiO}_2\text{-Ag}$. $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 0.5% A. SEM B. SEM-EDX $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 1.5% C. SEM B. SEM-EDX

VIII.4. PRUEBAS *IN VIVO*

VIII.4.1. PRUEBA AGUDA

VIII.4.1.1. Peso corporal

En la tabla 8 se presenta el peso de las ratas Wistar a los días 1, 7 y 14 del tratamiento. Con respecto al grupo control, no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) respecto a los tratamientos (Fig. 34), a excepción de las ratas Wistar con tratamiento de nano-partículas de $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$, presentando un aumento en el peso corporal del 14.4% en el día 14 de tratamiento (** $p > 0.05$).

Tabla 8. Efecto de las nano-partículas de TiO_2 -Sigma-Aldrich (5mg/kg, iv), $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ (5mg/kg, iv) y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (5mg/kg, iv) en el peso corporal de ratas Wistar machos a las 24 horas 7 y 14 días. Los valores expresan la media (\pm SEM), $n=10$

PESO CORPORAL DE LA RATA WISTAR				
	Control	Tratamiento (5mg/kg, iv)		
		TiO_2	$\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$	$\text{TiO}_2\text{-Ag}$
Día 0	240.6 \pm 6.51	243.3 \pm 8.76	244.3 \pm 3.58	241.4 \pm 3.31
Día 1	241.2 \pm 6.59	242.0 \pm 9.31	245.5 \pm 3.88	239.1 \pm 3.27
Día 7	244.7 \pm 6.65	248.8 \pm 9.94	262.1 \pm 3.16	243.0 \pm 3.16
Día 14	244.2 \pm 6.22	257.2 \pm 10.28	279.5 \pm 4.03	252.2 \pm 3.60

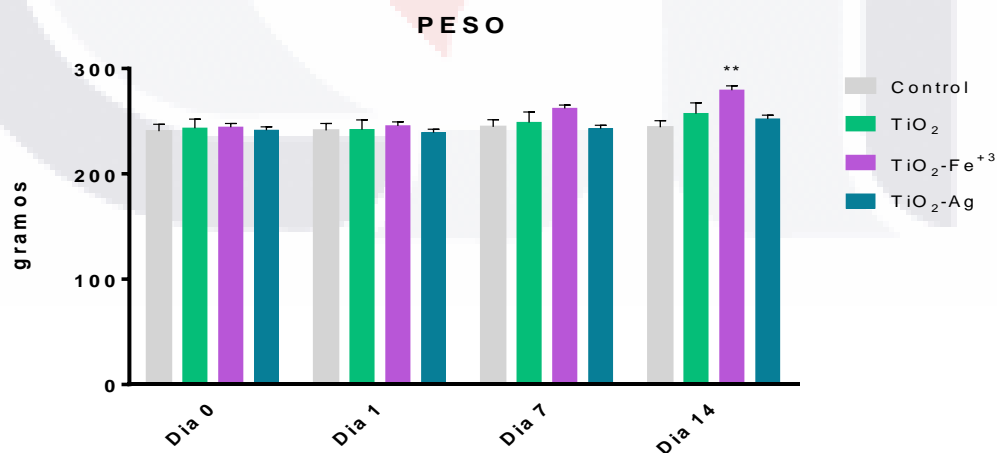


Figura 34. Peso corporal de ratas Wistar machos tratadas con TiO_2 -Sigma-Aldrich (5mg/kg, iv), $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ (5mg/kg, iv) y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (5mg/kg, iv) a las 0, 24 horas, 7 y 14 días. Barras marcadas (**) representan diferencia significativa con el control ($p < 0.01$). Los valores expresan la media (SEM), $n=10$

VIII.4.1.2. Pruebas de Funcionamiento Hepático

En la tabla 9 se presentan los valores medios de la concentración de los diferentes parámetros bioquímicos: Transaminasa Aspartato Aminotransferasa (AST), Alanino Aminotransferasa (ALT), Proteínas Totales (PT), Albumina Sérica (ALB), Globulinas (GLOB), Relación Albumina-Globulina (R A/G), Fosfatasa Alcalina (ALKP), Bilirrubina Total (BT), Bilirrubina Directa (BD) y Bilirrubina Indirecta (BI) a los días 1, 7 y 14 de tratamiento.

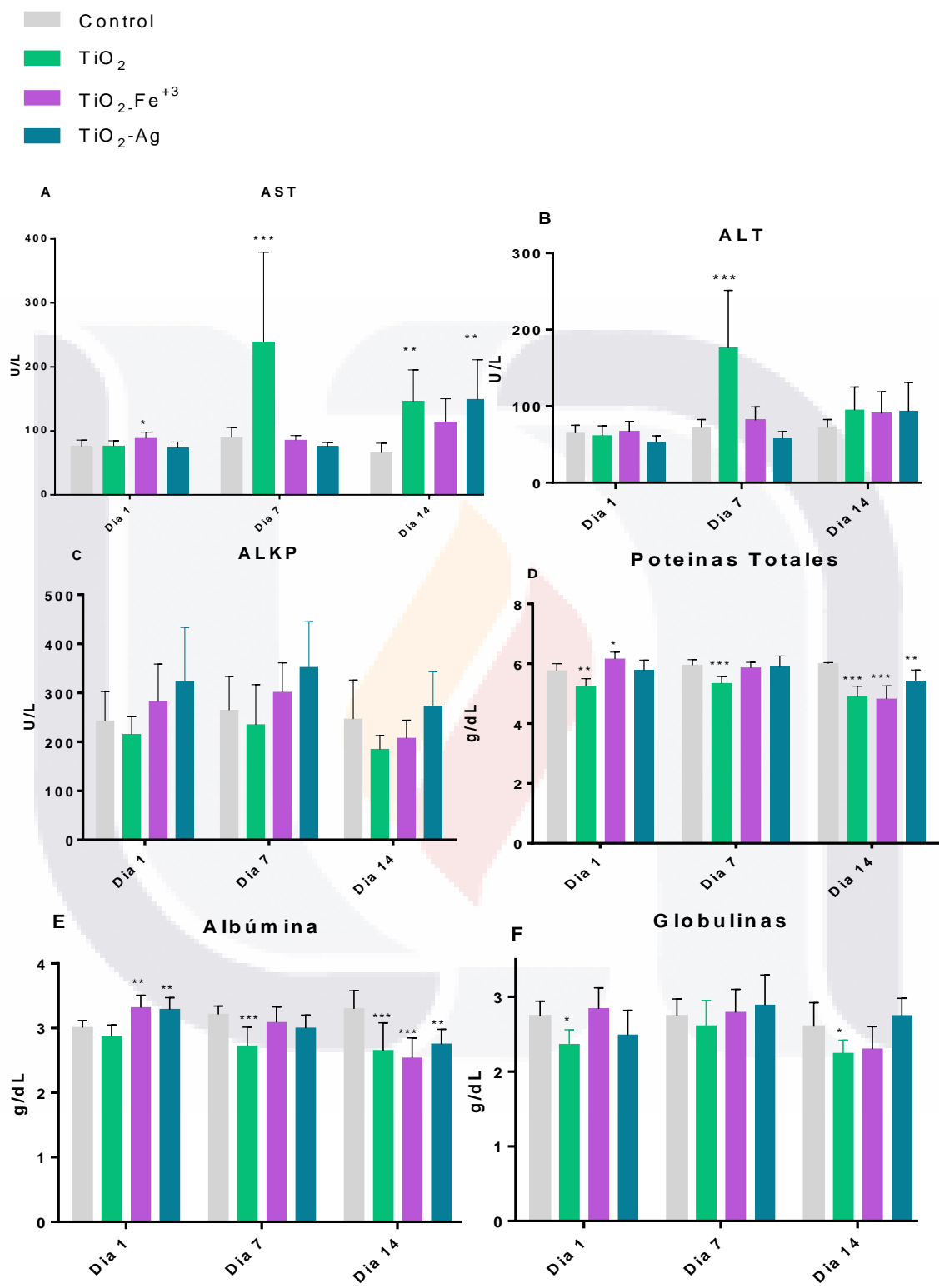
Respecto al tratamiento de TiO_2 , la actividad enzimática de AST (Fig. 35-A) aumentó 2 veces respecto el control al día 7 y 14 de tratamiento, disminuyendo hasta un 60% al día 14 respecto al día 7 de tratamiento, mientras que ALT incremento 2.45 veces su concentración respecto al control el día 7, no observando diferencias significativas con el control al día 14 (Fig.35-B). La actividad de ALKP aumentó un 12% respecto al control los días 1 y 7 del tratamiento disminuyendo hasta un 33% el día 14 (Fig.35-C). Las ratas Wistar macho tratadas con TiO_2 presentaron una disminución en los niveles séricos de proteínas totales respecto al control siendo de 9.7%, 11.42% y 22.6% a los días 1, 7 y 14 (Fig.35-D) observando el mismo fenómeno en la concentración de albúmina (Fig. 35-E) con valores de 1.8%, 18.0% y 24.5% por debajo del control. En el caso de la concentración de bilirrubinas, se observó un aumento respecto al control al día 7 (Fig. 35-F), debido al aumento de las dos fracciones, bilirrubina directa (Fig. 35-G) y bilirrubina indirecta (Fig. 35-H), mientras que a los 14 días no hubo diferencia significativa con el control.

Por otra parte, el tratamiento con $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ presentó diferencia significativa con el control al día 14 de tratamiento, observando un incremento del 30% en la actividad enzimática de ALT (Fig. 35-B) y dos veces el control la actividad de AST (Fig. 35-A), mientras que ALKP (Fig. 35-C) disminuyó en un 20%. Así mismo, se observó una disminución en la concentración de proteínas totales (Fig. 35-D) y albúmina (Fig. 35-E) del 25% y 30% respectivamente. Respecto a los niveles de bilirrubina total (Fig. 35-F), estos se encontraron por encima del control sin observar diferencias respecto a las fracciones con el control (Fig. 35-G Y 35-H).

De la misma manera que con $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$, las ratas Wistar macho expuestas a tratamiento con $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ presentaron diferencia significativa con el control al día 14 de tratamiento en AST (\uparrow 2.3 veces la actividad), ALT (\uparrow 30%), PT (\downarrow 10%), Albumina (\downarrow 20%) y BD (\uparrow 2.5 veces) (Fig. 35).

Tabla 9. Resultados de las pruebas bioquímicas de funcionamiento hepático en suero de ratas Wistar machos tratados con nano-partículas de TiO₂-Sigma-Aldrich (5mg/kg, iv), TiO₂-Fe⁺³ (5mg/kg, iv) y TiO₂-Ag (5mg/kg, iv) a las 24 horas 7 y 14 días. Los valores expresan la media (± SEM), n=10

		Control	Tratamiento (5mg/kg, iv)		
			TiO ₂	TiO ₂ -Fe ⁺³	TiO ₂ -Ag
DÍA 1	AST (U/L)	75.67 ± 3.12	76.28 ± 2.78	88.19 ± 3.09	72.99 ± 3.03
	ALT (U/L)	64.88 ± 3.27	61.44 ± 4.34	66.36 ± 4.36	52.98 ± 2.64
	ALKP (U/L)	242.7 ± 18.87	215.0 ± 11.40	282.2 ± 24.14	323.2 ± 38.84
	PT (g/dL)	5.76 ± 0.07	5.25 ± 0.08	6.16 ± 0.07	5.78 ± 0.10
	ALB (g/dL)	3.01 ± 0.03	2.87 ± 0.05	3.32 ± 0.06	3.29 ± 0.05
	GLOB (g/dL)	2.74 ± 0.06	2.36 ± 0.06	2.84 ± 0.08	2.49 ± 0.10
	R A/G	1.11 ± 0.02	0.91 ± 0.12	1.19 ± 0.36	1.33 ± 0.06
	BT (mg/dL)	0.010 ± 0.006	0.078 ± 0.007	0.030 ± 0.004	0.049 ± 0.004
	BD (mg/dL)	0.016 ± 0.001	0.025 ± 0.005	0.023 ± 0.001	0.038 ± 0.005
	BI (mg/dL)	0.013 ± 0.002	0.052 ± 0.009	0.015 ± 0.001	0.010 ± 0.004
DÍA 7	AST (U/L)	89.44 ± 5.01	238.4 ± 44.55	85.47 ± 2.28	75.50 ± 2.00
	ALT (U/L)	71.90 ± 3.60	176.22 ± 23.8	81.56 ± 5.58	57.71 ± 2.93
	ALKP (U/L)	264.5 ± 21.74	234.8 ± 25.85	300.9 ± 18.98	351.7 ± 29.57
	PT (g/dL)	5.95 ± 0.06	5.34 ± 0.07	5.86 ± 0.06	5.89 ± 0.11
	ALB (g/dL)	3.21 ± 0.04	2.72 ± 0.13	3.09 ± 0.07	3.00 ± 0.06
	GLOB (g/dL)	2.74 ± 0.07	2.61 ± 0.10	2.79 ± 0.09	2.89 ± 0.12
	R A/G	1.18 ± 0.04	1.06 ± 0.07	1.14 ± 0.06	1.07 ± 0.06
	BT (mg/dL)	0.080 ± 0.006	0.124 ± 0.008	0.041 ± 0.004	0.024 ± 0.001
	BD (mg/dL)	0.026 ± 0.003	0.039 ± 0.003	0.009 ± 0.00	0.024 ± 0.006
	BI (mg/dL)	0.057 ± 0.008	0.085 ± 0.007	0.028 ± 0.005	0.001 ± 0.003
DÍA 14	AST (U/L)	65.60 ± 5.06	146.1 ± 15.58	113.7 ± 11.54	149.1 ± 19.60
	ALT (U/L)	71.90 ± 3.60	94.78 ± 9.60	90.46 ± 8.98	93.68 ± 11.85
	ALKP (U/L)	246.5 ± 26.50	184.8 ± 8.88	207.4 ± 11.67	272.6 ± 22.22
	PT (g/dL)	6.00 ± 0.01	4.89 ± 0.11	4.82 ± 0.11	5.44 ± 0.11
	ALB (g/dL)	3.30 ± 0.09	2.65 ± 0.11	2.54 ± 0.09	2.75 ± 0.07
	GLOB (g/dL)	2.60 ± 0.10	2.24 ± 0.05	2.30 ± 0.09	2.75 ± 0.07
	R A/G	1.26 ± 0.06	1.21 ± 0.07	1.14 ± 0.06	1.06 ± 0.06
	BT (mg/dL)	0.010 ± 0.005	0.017 ± 0.012	0.090 ± 0.009	0.008 ± 0.002
	BD (mg/dL)	0.020 ± 0.005	0.020 ± 0.012	0.009 ± 0.009	0.060 ± 0.002
	BI (mg/dL)	0.010 ± 0.005	0.000 ± 0.013	0.009 ± 0.000	0.000 ± 0.002



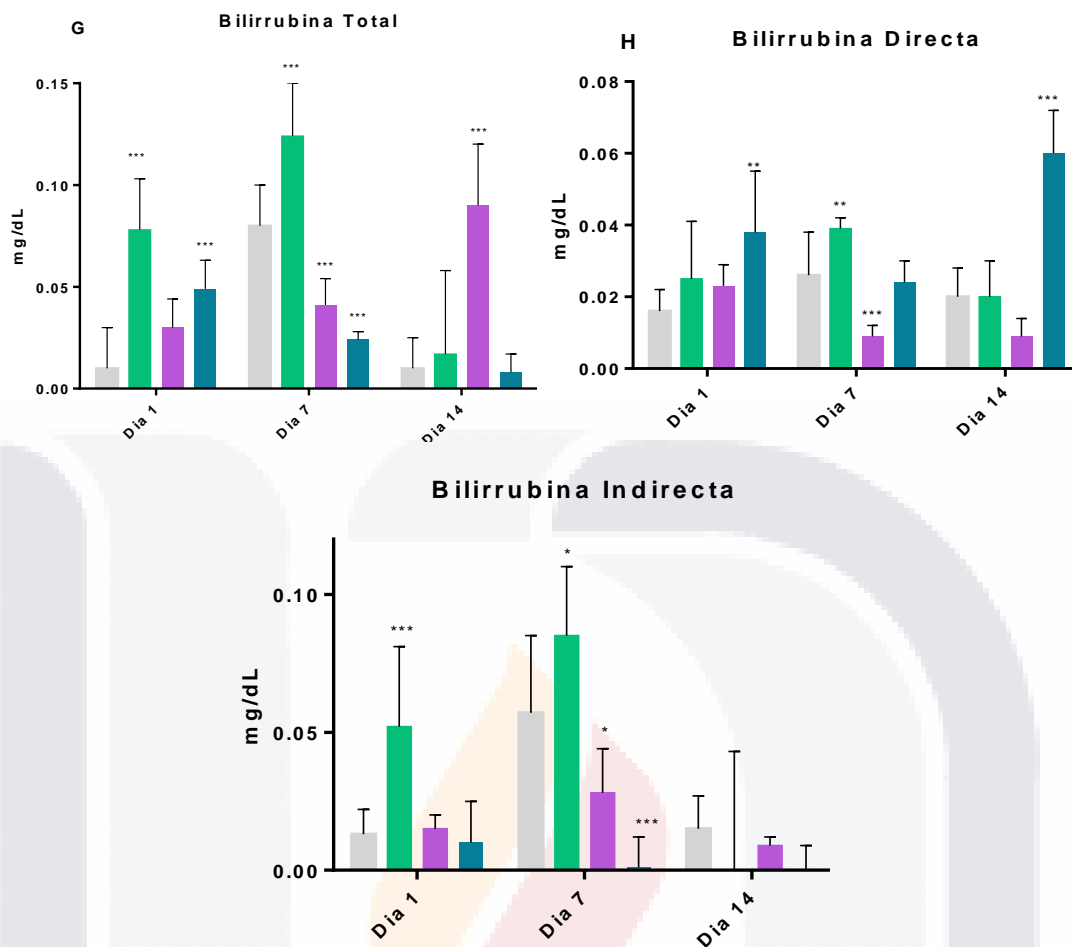


Figura 35. Resultados de las pruebas bioquímicas de funcionamiento hepático en suero de ratas Wistar machos tratados con nano-partículas de TiO₂-Sigma-Aldrich (5mg/kg, iv), TiO₂-Fe³⁺ (5mg/kg, iv) y TiO₂-Ag (5mg/kg, iv) a las 24 horas 7 y 14 días. Barras marcadas con * (p<0.05), ** (p<0.01), y *** (p<0.005), representan diferencia significativa con el control. Los valores expresan la media (SEM), n=10.

VIII.4.2. PRUEBA SUB-AGUDA

La prueba sub-aguda se realizó en ratas Wistar machos tras la administración intravenosa de 9 dosis de nano-partículas (TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$) de 5 mg/kg de peso de frente a un grupo control.

VIII.4.2.1. Peso corporal

La fig. 36 muestra los pesos de los grupos tratados con nano-partículas observando que no hay una diferencia con el control.

Tabla 10. Peso corporal de ratas Wistar tras el tratamiento sub-agudo con nano-partículas de TiO_2 -Sigma-Aldrich (5mg/kg, iv c/7 días) y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ (5mg/kg, iv c/7 días) a los 0, 29 y 56 días. Los valores expresan la media (\pm SEM).

	Peso (g)		
	Control	Tratamiento (5mg/kg, iv c/7 días)	
		TiO_2	$\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$
Día 0	249.0 \pm 6.80 (n=10)	241.9 \pm 7.03 (n=10)	231.0 \pm 9.09 (n=9)
Día 29	262.0 \pm 8.14 (n=10)	285.1 \pm 8.45 (n=9)	275.2 \pm 12.87 (n=8)
Día 56	295.8 \pm 9.02 (n=10)	287.8 \pm 7.65 (n=9)	297.5 \pm 15.91 (n=7)



Figura 36. Peso corporal de ratas Wistar machos bajo un tratamiento sub-agudo con NPs de TiO_2 -Sigma-Aldrich (5mg/kg, iv c/7 días) y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ (5mg/kg, iv c/7 días) a los 29 y 56 días. Los tratamientos no presentaron diferencia significativa con el control ($p > 0.05$). Los valores expresan la media (SEM), n=10

VIII.4.2.2. Pruebas de Funcionamiento Hepático. Prueba Sub-Aguda

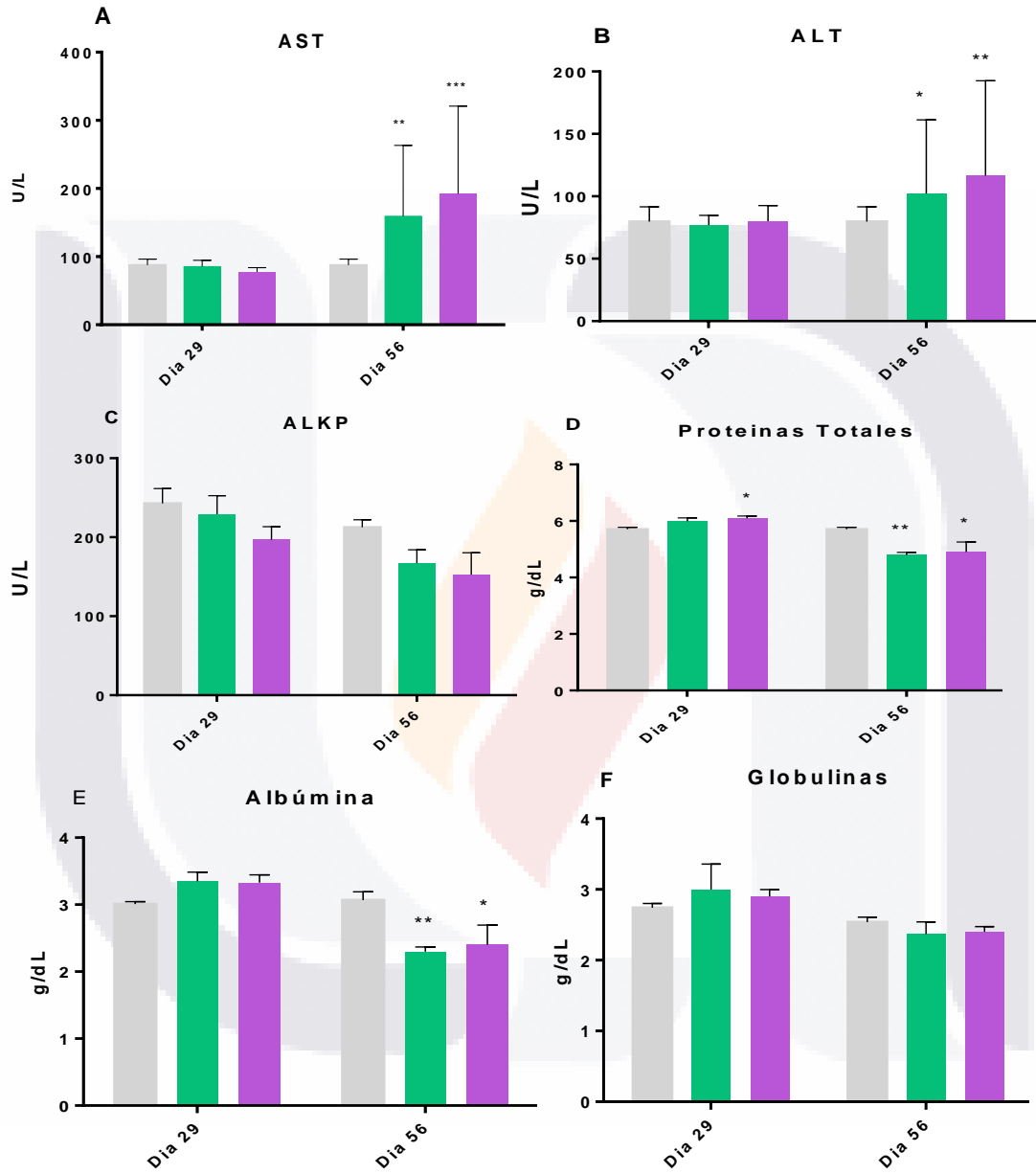
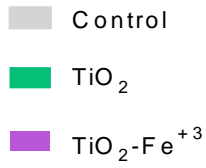
Las ratas Wistar macho tratadas con TiO_2 , mostraron un incremento del 82% y 28% en la actividad de AST (Fig. 37-A) y ALT (Fig. 37-B) respecto al control, mientras que ALKP (Fig. 37-C) no mostró diferencias con el control aunque, al analizar la figura se observa una disminución de la actividad enzimática en el día 56 respecto al día 29. Los niveles plasmáticos de proteínas totales (Fig. 37-D), albúmina (Fig. 37-E) y globulinas (Fig. 37-F) al día 56 disminuyeron un 20%, 33% y 26% respecto al control. La concentración de Bilirrubinas mostró un aumento al día 29 de 3 veces el control, mientras que al día 56 se observa una disminución de 3 a 4 veces el control (Fig. 37-G, 36-H y 37-I).

Respecto al grupo tratado con $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$, la actividad enzimática de AST (Fig. 37-A) y ALT (Fig. 37-B) fue mayor (119% y 46.1% respectivamente) que lo observado con el grupo de TiO_2 . La concentración plasmática de proteínas totales (Fig. 37-D), albúmina (Fig. 37-E) y globulinas (Fig. 37-F), también se vieron alterados al aumentar sus niveles en un 25%, 28% y 20% respecto al control al día 56 de tratamiento. Los niveles de Bilirrubina total en plasma, mostraron un incremento de 2.7 veces el control al día 29, disminuyendo la misma proporción al día 56 de tratamiento (Fig. 37-G). Respecto a la BD los niveles aumentaron hasta un 80% manteniéndose hasta el día 56 de tratamiento (Fig. 37-H).

Tabla 11. Resultados de las pruebas bioquímicas de funcionamiento hepático en suero de ratas Wistar machos tras el tratamiento sub-agudo con nano-partículas de TiO_2 -Sigma-Aldrich (5mg/kg, iv c/7 días) y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ (5mg/kg, iv c/7 días) a los 29 y 56 días. Los valores expresan la media (\pm SEM), n=10

		Tratamiento (5mg/kg, iv)		
		Control	TiO_2	$\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$
DÍA 29	AST (U/L)	75.00 \pm 3.12 (n=10)	85.22 \pm 3.00 (n=10)	77.60 \pm 2.19 (n=8)
	ALT (U/L)	64.88 \pm 3.27 (n=10)	76.96 \pm 2.46 (n=10)	80.00 \pm 4.21 (n=9)
	ALKP (U/L)	242.9 \pm 18.87 (n=10)	229.2 \pm 23.11 (n=10)	196.9 \pm 16.39 (n=9)
	PT (g/dL)	5.76 \pm 0.07 (n=10)	5.99 \pm 0.12 (n=10)	6.10 \pm 0.80 (n=9)
	ALB (g/dL)	3.01 \pm 0.03 (n=10)	3.35 \pm 0.13 (n=10)	3.33 \pm 0.11 (n=9)

		(n=10)	(n=10)	(n=9)
	GLOB (g/dL)	2.74 ± 0.06 (n=10)	3.00 ± 0.35 (n=10)	2.90 ± 0.09 (n=9)
	R A/G	1.11 ± 0.02 (n=10)	1.13 ± 0.12 (n=10)	1.20 ± 0.07 (n=9)
	BT (mg/dL)	0.029 ± 0.003 (n=10)	0.078 ± 0.006 (n=10)	0.080 ± 0.010 (n=9)
	BD (mg/dL)	0.016 ± 0.007 (n=10)	0.029 ± 0.008 (n=10)	0.030 ± 0.00 (n=9)
	BI (mg/dL)	0.013 ± 0.002 (n=10)	0.048 ± 0.006 (n=10)	0.060 ± 0.006 (n=9)
DÍA 56	AST (U/L)	87.50 ± 2.78 (n=10)	159.2 ± 34.71 (n=9)	192.4 ± 48.58 (n=7)
	ALT (U/L)	79.79 ± 3.70 (n=10)	102.0 ± 19.74 (n=9)	116.6 ± 28.71 (n=7)
	ALKP (U/L)	212.5 ± 9.71 (n=10)	167.2 ± 16.89 (n=9)	152.5 ± 27.88 (n=7)
	PT (g/dL)	5.71 ± 0.06 (n=10)	4.79 ± .10 (n=9)	4.90 ± 0.35 (n=7)
	ALB (g/dL)	3.07 ± 0.12 (n=10)	2.30 ± 0.07 (n=9)	2.40 ± 0.29 (n=7)
	GLOB (g/dL)	2.54 ± 0.06 (n=10)	2.37 ± 0.17 (n=9)	2.40 ± 0.07 (n=7)
	R A/G	1.26 ± 0.04 (n=10)	0.72 ± 0.09 (n=9)	1.00 ± 0.11 (n=7)
	BT (mg/dL)	0.135 ± 0.006 (n=10)	0.025 ± 0.004 (n=9)	0.050 ± 0.015 (n=7)
	BD (mg/dL)	0.03 ± 0.001 (n=10)	0.013 ± 0.002 (n=9)	0.030 ± 0.007 (n=7)
	BI (mg/dL)	0.095 ± 0.006 (n=10)	0.011 ± 0.004 (n=9)	0.020 ± 0.011 (n=7)



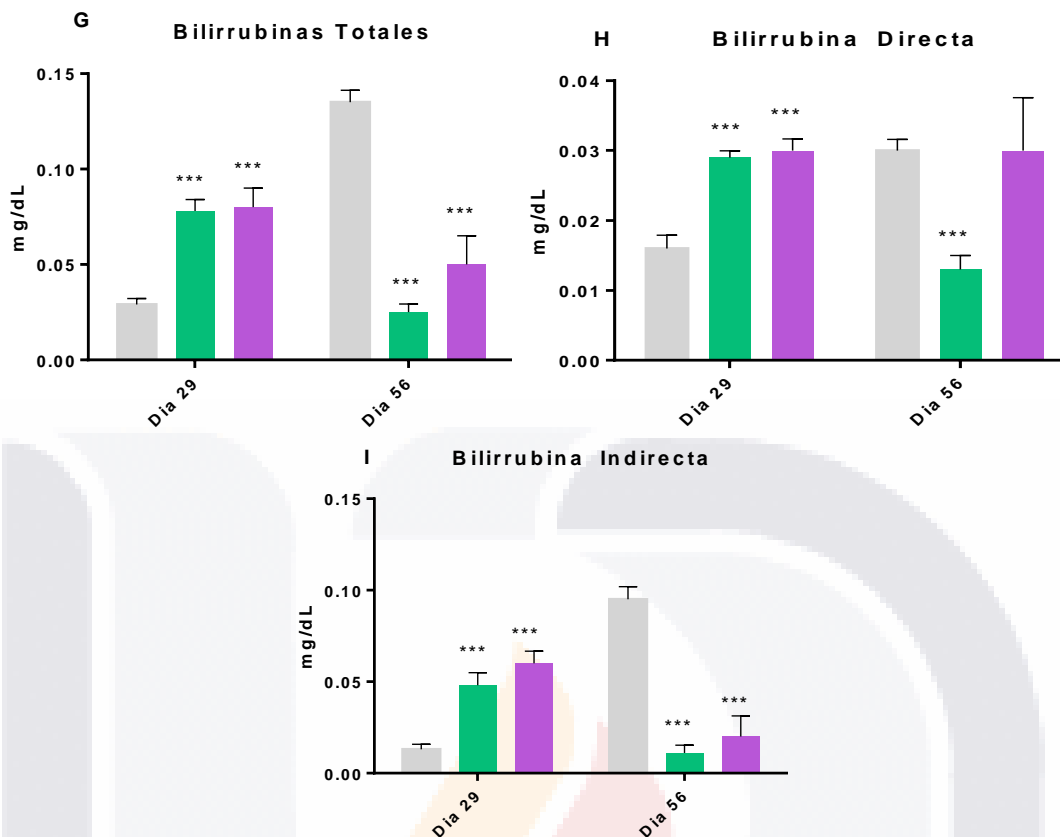


Figura 37. Resultados de las pruebas bioquímicas de funcionamiento hepático en suero de ratas Wistar machos con tratamiento sub-agudo de nano-partículas de TiO₂-Sigma-Aldrich (5mg/kg, iv c/7 días) y TiO₂-Fe⁺³ (5mg/kg, iv c/ 7 días) a los 29 y 56 días. Barras marcadas con * (p<0.05), ** (p<0.01), y *** (p<0.005), representan diferencia significativa con el control. Los valores expresan la media (SEM), n=10.

VIII.4.2.3. ANALISIS HISTOLÓGICO EN HÍGADO

La figura 38 muestra el estudio histopatológico con la tinción de H&E de los grupos tratados con nano-partículas y el grupo control tras una exposición aguda. El grupo control (38-A y 38-B) presentó organización del hepatocito, acidofilia, lobulillos y sinusoides normales sin cambios morfológicos. Las imágenes 38-C y 38-D corresponden al grupo tratado con TiO₂ mostrando una organización normal, lobulillos y sinusoides de tamaño y morfología normal, citoplasma de aspecto granuloso sin modificaciones en la acidofilia, vacuolización citoplasmática, mayor volumen celular y mayor espacio en los sinusoides. Las imágenes 38-E y 38-F muestran mayor volumen nuclear, citoplasma granulado y vacuolización citoplasmática tras la exposición aguda a TiO₂-Fe⁺³. Las imágenes 38-E y 38-F muestran el estudio histopatológico tras la exposición a TiO₂-Ag observando cambios en la organización celular, aumento en el volumen nuclear y citoplasmático observando un gradiente de daño de menor a mayor con respecto a la vena porta central.

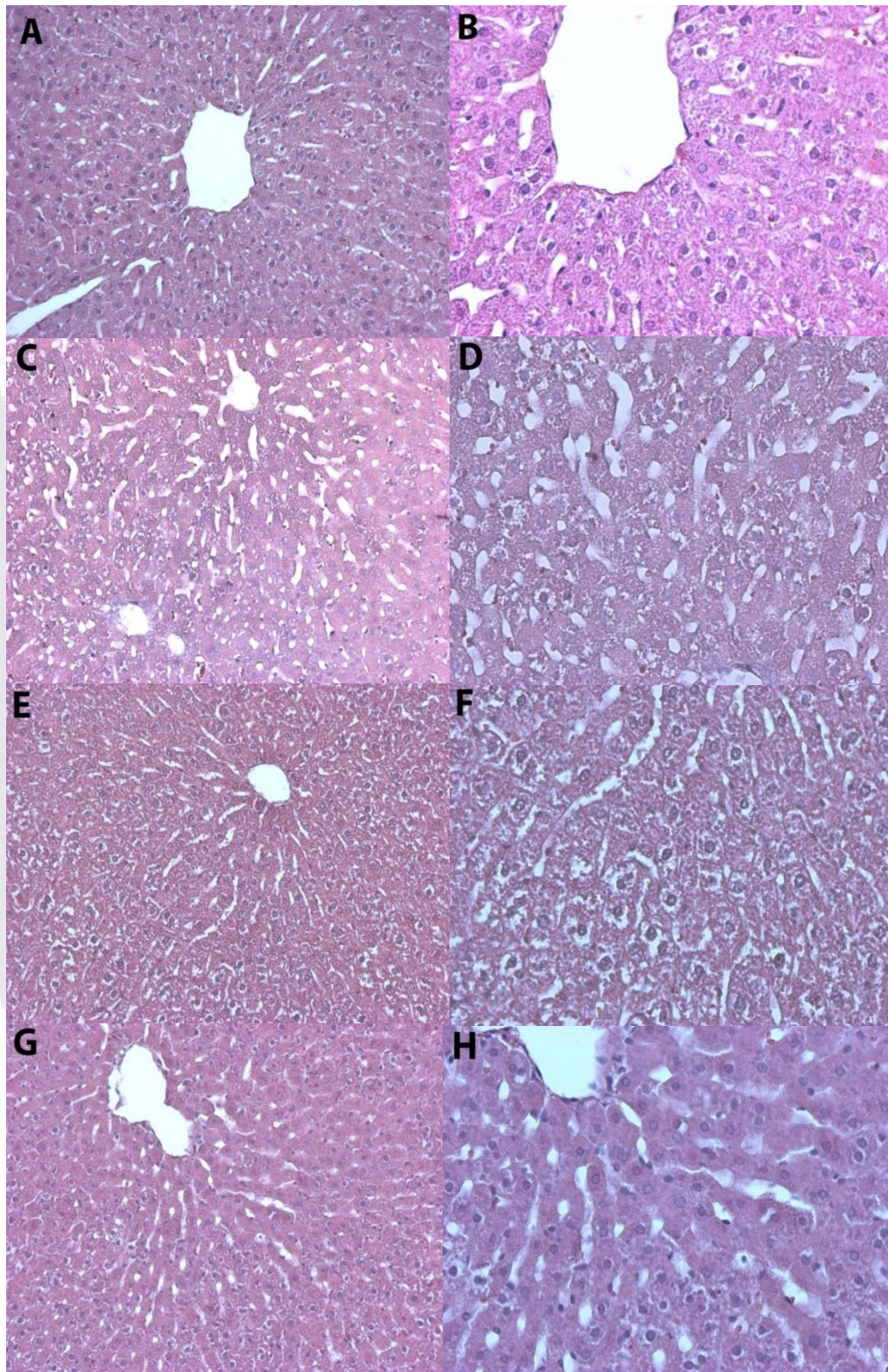


Figura 38. Análisis histológico de muestras de hígado a través de la tinción H&E. Prueba Aguda A. Control 10X, B. Control 20X, C. TiO₂ 10X, D. TiO₂ 20X, E. TiO₂-Fe⁺³ 10X F. TiO₂-Fe⁺³ 20X, G. TiO₂-Ag 10X, H. TiO₂-Ag 20X.

La figura 39 muestra las imágenes del estudio histopatológico con la tinción de H&E de los grupos tratados con nano-partículas y el grupo control tras una exposición sub-aguda. Las figuras 39-A y 39-B representan al grupo control. El análisis tras la exposición a TiO_2 (39-C y 39-D) muestra que no se presentaron alteraciones morfológicas, sin embargo, el grupo tratado con $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ (39-E y 39-F muestra degeneración hidrópica vacuolar y degeneración balonzante, un signo de lesión reversible.

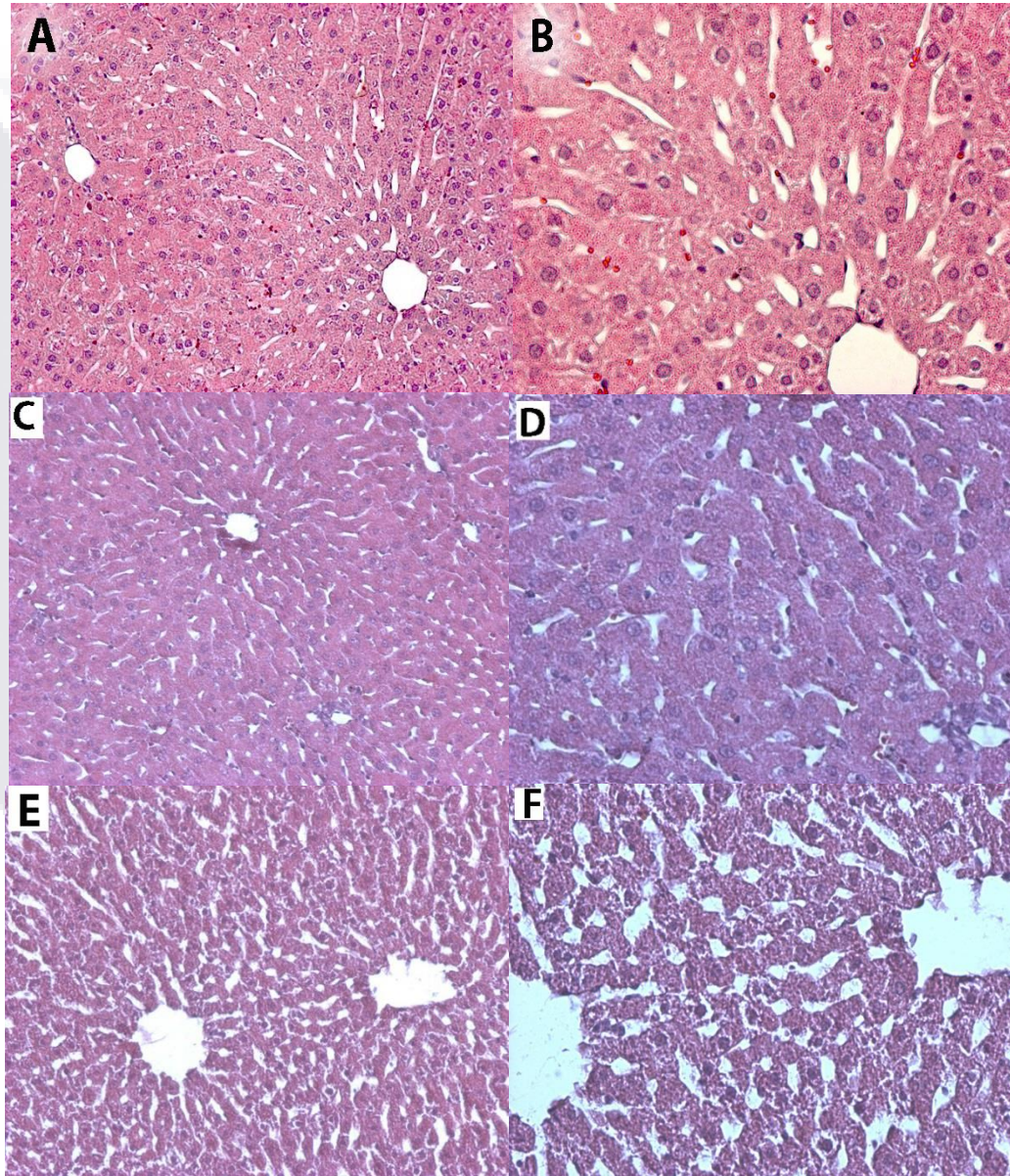


Figura 39. Análisis histológico de muestras de hígado a través de la tinción H&E. Prueba Sub-Aguda A. Control 10X, B. Control 20X, C. TiO_2 10X, D. TiO_2 20X, E. $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 10X F. $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 20X

VIII.4.3. CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS EN SANGRE

Varias investigaciones han demostrado que nano-partículas de TiO_2 promueven la expresión y concentración de interleucinas *in vivo* e *in vitro*. Para poder observar el papel de los procesos inflamatorios en la toxicidad del hígado por nano-partículas de TiO_2 , se determinó por ELISA, la concentración de IL-2, IL-6, IL-10, INF- γ y TNF- α en suero de rata tras la administración de nano-materiales de TiO_2 (dopado y sin dopar).

Respecto a la concentración en suero de IL-2 (figura 40-A) e IL-6 (figura 40-B) tras una inyección única de NPs (5.0 mg/kg) en ratas Wistar, el análisis de ELISA mostró que las nano-partículas de TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$, no activan la producción de IL-2 o IL-6 sin observar diferencia significativa con el control ($p < 0.05$). En el caso de la IL-10 (Figura 40-C), los datos mostraron un incremento en los niveles séricos de IL-10 respecto al control tras la exposición a nano-partículas de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ($p < 0.001$) observándose un incremento en IL-10 al día 7 y 14 en plasma respecto al día 1 de tratamiento. Por otro lado, los grupos tratados con TiO_2 o $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ no presentaron diferencia significativa con el control ($p < 0.05$). La figura 40-D muestra la producción de TNF- α en la cual se observa un incremento significativo en la concentración en plasma de los diferentes grupos tratados respecto al control ($p < 0.001$). En la tabla 12 se presentan las concentraciones de interleucinas a los días 1, 7 y 14 tras el tratamiento con las diferentes NPs

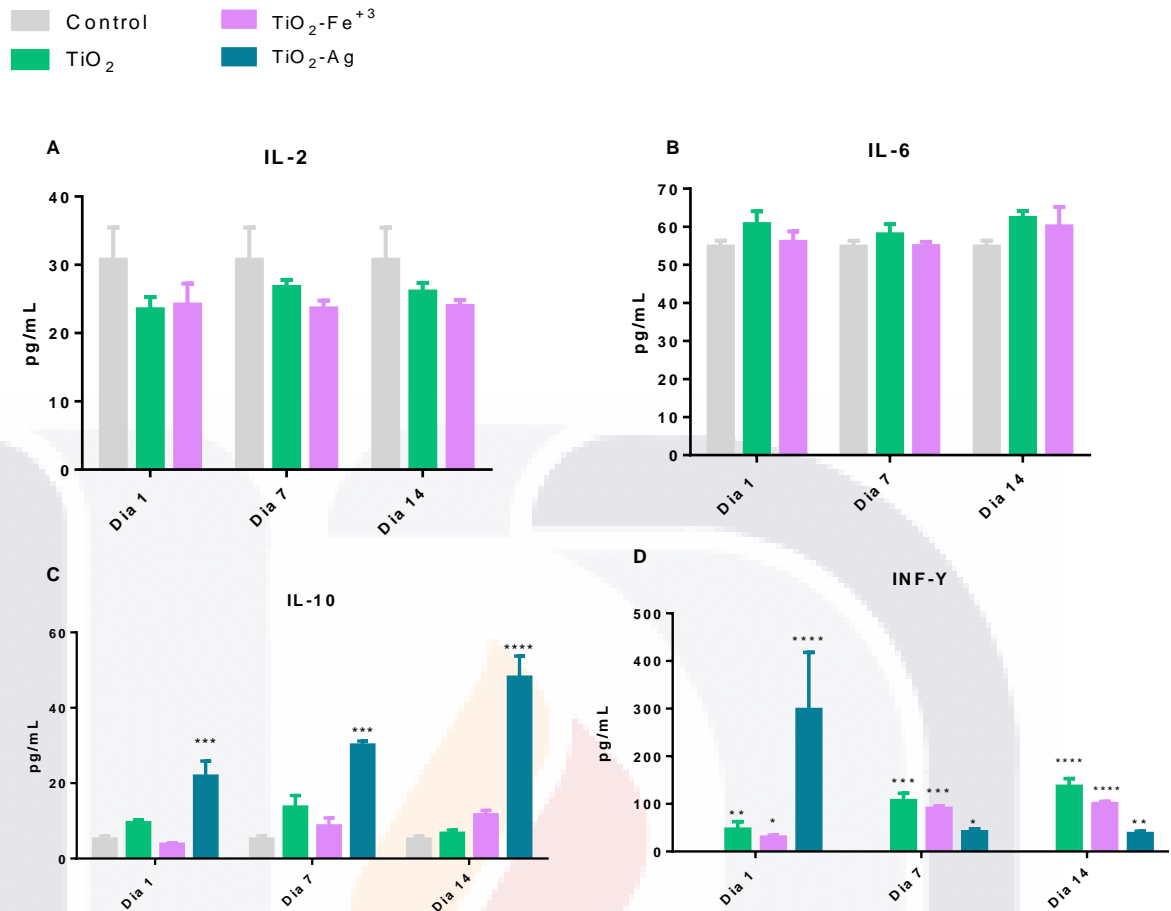


Figura 40: Efecto de las nano-partículas en los niveles séricos de ratas Wistar de **A.** IL-2, **B.** IL-6, **C.** IL-10 y **D.** INF-γ; tras una inyección intravenosa de 5 mg/mL de TiO₂, TiO₂-Fe⁺³ 3% y TiO₂-Ag 1.5%. Los datos representan el efecto tras la exposición a los NMs después de 1, 7 y 14 días de tratamiento. Barras marcadas con * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.005) y **** (p<0.001), representan diferencia significativa con el control. Los valores expresan la media (SEM), n=5.

La Figura 41 presenta los niveles de interleucinas en suero de los grupos al día 14 de tratamiento. En esta gráfica, se puede observar un incremento en los valores de INF-γ, TNF-α (p<0.001) en todos los grupos, mientras que la concentración de IL-10 sólo se vio aumentada en el grupo tratado con TiO₂-Ag.

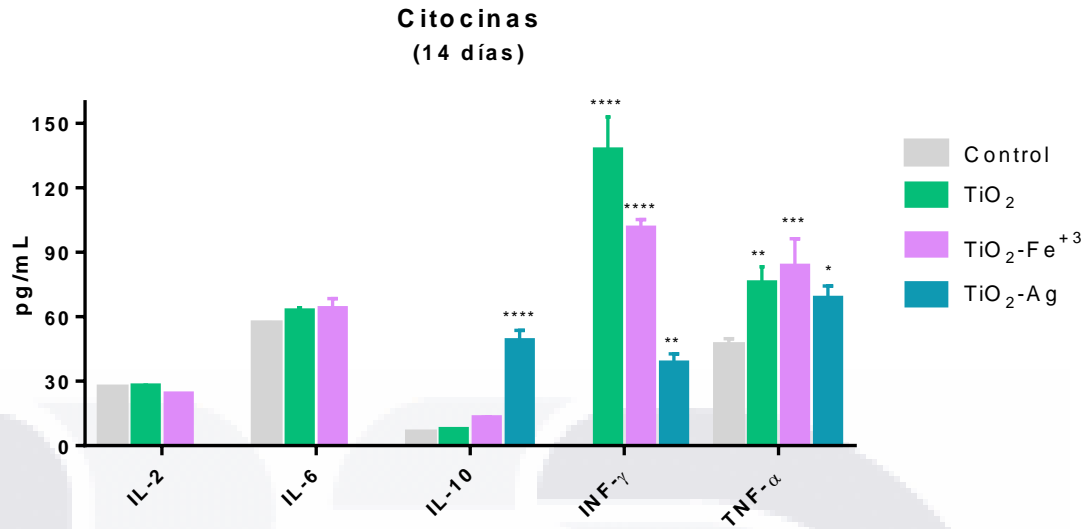


Figura 41: Efecto de las nano-partículas de TiO₂, TiO₂-Fe⁺³ 3% y TiO₂-Ag 1.5% en los niveles séricos en rata Wistar de IL-2, IL-6, IL-10, INF-γ y TNF-α tras una exposición aguda al día 14 de tratamiento. Barras marcadas con * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.005) y **** (p<0.001), representan diferencia significativa con el control. Los valores expresan la media (SEM), n=5.

Tabla 12: Concentración de interleucinas en suero de rata Wistar tras una exposición aguda a nano-partículas de TiO₂, TiO₂-Fe⁺³ 3% y TiO₂-Ag 1.5%. Los datos representan la media ± SEM

		PRUEBA AGUDA- INTERLEUCINAS EN SUERO (pg/mL)				
Tratamiento		IL-2	IL-6	IL-10	INF-γ	TNF-α
Control	Día 1	30.7 ± 4.21	54.8 ± 1.35	5.2 ± 0.71	0.0 ± 0.78	N/A
	Día 7	30.7 ± 4.21	54.8 ± 1.35	5.2 ± 0.71	0.0 ± 0.78	N/A
	Día 14	30.7 ± 4.21	54.8 ± 1.35	5.2 ± 0.71	0.0 ± 0.78	45.8 ± 3.51
TiO ₂	Día 1	23.5 ± 1.61	60.7 ± 3.05	9.5 ± 0.68	47.0 ± 13.6	N/A
	Día 7	26.7 ± 0.92	58.0 ± 2.35	13.7 ± 2.64	107.1 ± 13.0	N/A
	Día 14	26.0 ± 1.14	62.3 ± 1.61	6.7 ± 0.71	136.8 ± 14.0	75.02 ± 7.08
TiO ₂ -Fe ⁺³	Día 1	24.2 ± 2.76	56.0 ± 2.43	3.8 ± 0.28	30.3 ± 3.64	N/A
	Día 7	23.6 ± 1.01	54.9 ± 1.02	8.7 ± 1.70	90.7 ± 4.35	N/A
	Día 14	23.9 ± 0.78	63.0 ± 4.56	11.6 ± 0.96	100.4 ± 4.18	82.7 ± 11.7
TiO ₂ -Ag	Día 1	N/A	N/A	21.9 ± 3.24	297.9 ± 104.0	N/A
	Día 7	N/A	N/A	30.1 ± 0.91	41.3 ± 5.74	N/A
	Día 14	N/A	N/A	48.1 ± 4.85	37.7 ± 4.36	67.8 ± 5.62

*N/A: datos no analizados.

Con respecto a la administración repetida de nano-partículas de TiO_2 o TiO_2-Fe^{+3} a las ratas Wistar (prueba sub-aguda), la figura 42 presenta los niveles en plasma de IL-6, IL-10 y TNF- α a los 56 días de tratamiento. Respecto a los niveles plasmáticos de IL-6, el grupo tratado con TiO_2-Fe^{+3} mostró un incremento respecto al control ($p < 0.001$) e incluso con el grupo tratado con TiO_2 , el cuál no exhibió diferencia significativa con el control ($p > 0.05$). Los niveles de IL-10 y TNF- α no presentaron diferencia significativa con el control. Lo anterior con un nivel de confianza del 95%. Sin embargo se puede observar un aumento respecto al control de IL-10 y TNF- α en el plasma del grupo tratado con TiO_2

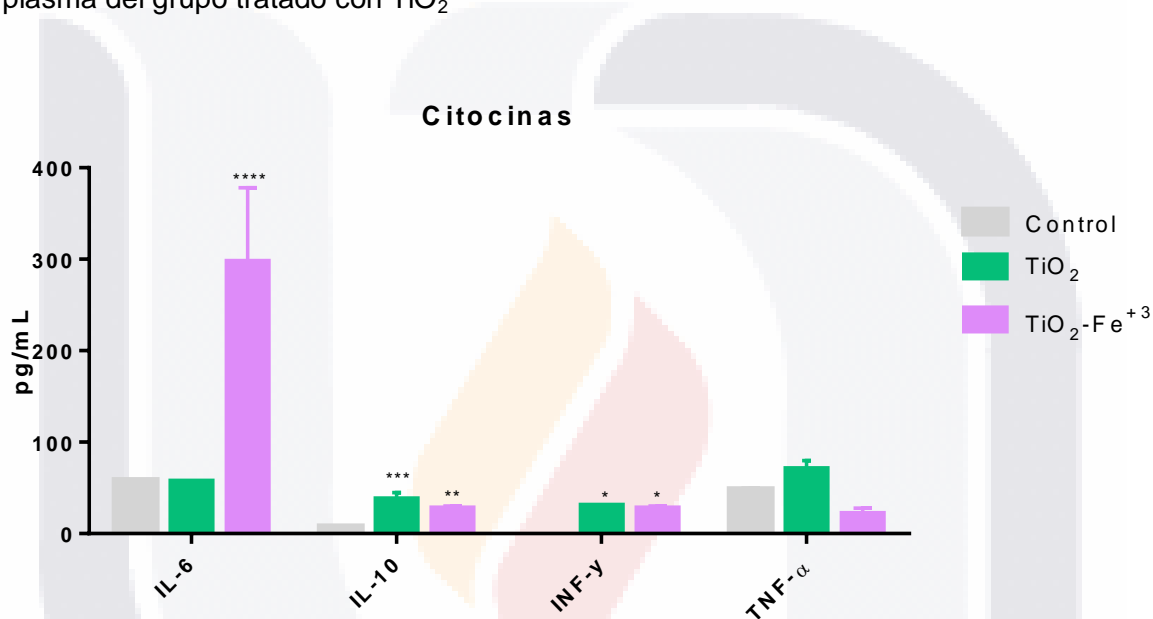


Figura 42: Efecto de las nano-partículas de TiO_2 y TiO_2-Fe^{+3} 3% en los niveles séricos de interleucinas IL-6, IL-10, y TNF- α tras inyecciones intravenosas repetidas (c/7 días). Los datos representan el efecto después de 56 días de tratamiento. Barras marcadas con **** ($p < 0.001$), representan diferencia significativa con el control. Los valores expresan la media (SEM), $n=5$.

Tabla 13: Concentración de interleucinas en suero de rata Wistar tras una exposición sub-aguda a nano-partículas de TiO_2 , TiO_2-Fe^{+3} 3% y TiO_2-Ag 1.5% después de 56 días de tratamiento. Los datos representan la media \pm SEM

PRUEBA SUB-AGUDA DÍA 56 DE TRATAMIENTO				
INTERLEUCINAS EN SUERO (pg/mL)				
Tratamiento	IL-6	IL-10	INF-γ	TNF-α
Control	55.9 \pm 1.16	5.16 \pm 0.72	0.0 \pm 0.78	45.8 \pm 3.51
TiO ₂	55.3 \pm 1.50	35.9 \pm 7.64	28.8 \pm 0.75	68.9 \pm 9.34
TiO ₂ -Fe ⁺³	295.6 \pm 33.9	25.7 \pm 3.80	25.7 \pm 3.80	19.9 \pm 6.69

*N/A: datos no analizados

IX. DISCUSIONES

El propósito de este estudio fue evaluar la toxicidad de los nano-materiales de TiO_2 , $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ a través de pruebas *in vivo* e *in vitro*. En particular, para la toxicidad *in vitro* se evaluó el efecto cito-tóxico en células rojas humanas mediante el estudio de la actividad hemolítica de los diferentes nano-materiales; además se evaluó la lixiviación de iones (dopantes) del material y su influencia en la toxicidad de los diferentes materiales. El estudio *in vivo* se realizó mediante la administración intravenosa de TiO_2 NPs a ratas Wistar adultos con el fin de obtener información que indique si existe daño hepático, a través de biomarcadores de daño hepático temprano, así como sobre la morfología de los hepatocitos mediante el análisis histológico. También se valoró la respuesta inflamatoria cuantificando citocinas (IL-10 e IL-2) e interferón- γ .

Análisis in vitro

El análisis de la actividad hemolítica de los nano-materiales es de suma importancia principalmente con los materiales que entran en contacto directo en la sangre, como es en el caso de las drogas dirigidas (Wen Fan et al, 2012) así como en la evaluación del riesgo toxicológico que puede ser producido por las nanopartículas debido al contacto constante (Haynes et al, 2010). Varias investigaciones han demostrado que las TiO_2 -NPs pueden llegar a diferentes órganos, mediante diferentes rutas de exposición, a través de la circulación sanguínea (Patri et al, 2009; Jiangxue et al, 2007; Wang et al, 2007), donde las células de mayor proporción (99%) son los eritrocitos (May et al, 1998). En este trabajo, la prueba de la actividad hemolítica *in vitro* se realizó con diferentes variables como: concentración, luz, oscuridad, temperatura y condición de las células rojas. Esto dio diferentes condiciones de vulnerabilidad a las células rojas para poder ligar el efecto hemolítico de los nano-materiales analizados.

Respecto a los nano-materiales de TiO_2 , no se observó hemólisis ocasionada por las TiO_2 -NPs en ninguna de las variables (figuras 14 y 15), pero al analizar cuantitativamente la actividad hemolítica, el TiO_2 ocasionó hemólisis en las muestras con RBC. Al respecto, los nano-materiales de TiO_2 presentaron mayor hemólisis en condiciones de luz (Figura 22), lo que puede ser debido a que el TiO_2

absorbe del 3 a 5% de energía en el rango de luz visible (Linsebigler et al, 1995). Al comparar los dos NMs de TiO_2 (Figura 22), el TiO_2 -Sigma-Aldrich produjo mayor grado de hemólisis que TiO_2 sintetizado en el laboratorio. Debe señalarse que el TiO_2 sintetizado tiene un menor tamaño (~ 10 nm) y, por tanto, una mayor área superficial que el TiO_2 -Sigma-Aldrich (~ 25 nm); sin embargo, el radio hidrodinámico en solución salina fisiológica fue de 830 nm y 774 nm respectivamente (figura 13-B), presentando una mayor estabilidad en el medio TiO_2 -Sigma-Aldrich con un potencial zeta de 48.01 mV contra 11.62 mV del TiO_2 sintetizado en el laboratorio (figura 13-A). Por lo tanto, ya que el TiO_2 Sigma-Aldrich presenta un menor radio hidrodinámico y una mayor estabilidad en el medio, éste pudiera penetrar con mayor facilidad a las membranas celulares. Recientemente, otros investigadores han reportado que las nanopartículas de TiO_2 comerciales producen hemólisis de eritrocitos humanos mediante esferocitosis y esquistocitosis (hematíes fragmentados). También encontraron capacidad de interacción de estas nanopartículas con la hemoglobina. En función de los resultados obtenidos de su trabajo (*in vitro*) sugieren que el contacto de las nanopartículas comerciales de TiO_2 con la sangre debe ser evaluado cuidadosamente por su potencial tóxico (Ghosh et al, 2013).

En el caso del $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ (Fig. 23) se observó que en las variables donde se presentó hemólisis (RBC), la actividad hemolítica aumenta en condiciones de luz comparada con la obscuridad, así como mayor actividad hemolítica que el TiO_2 Sigma-Aldrich (Fig. 22), lo que subraya la influencia del ion hierro III (Fe^{+3}) en la actividad foto-catalítica y la toxicidad de estos nano-materiales. La oxidación foto-catalítica del TiO_2 se lleva a cabo por la absorción de la radiación electromagnética en la zona más próxima del ultravioleta (Kazuya Nakata et al, 2012), que al ser dopado con metales es activo a la luz visible al disminuir la banda de ancho prohibido (E_g) del material semi-conductor (Mohammad, 2013). La tabla 4 muestra la disminución de E_g de TiO_2 (3.08eV) al doparlo con iones Fe^{+3} , observando que a mayor porcentaje de dopaje menor E_g (hasta 2.26 eV). Yu y col (2010) demostraron la absorción óptica mayor a 400 nm bajo luz visible del TiO_2 dopado con Fe^{+3} , debido a la transferencia de electrones de la banda de valencia del TiO_2 a la superficie del Fe^{+3} (y no a la banda de conducción). Lo anterior deriva en foto-producción de huecos generados en la banda de valencia, lo que contribuye en la oxidación de la materia orgánica y en la reducción foto-catalítica del oxígeno por la

foto-producción de especies de Fe^{+2} en la superficie de TiO_2 . Así también, la transferencia de electrones en los materiales de TiO_2 dopados con Fe^{+3} sintetizados en el laboratorio, puede estar dada a partir de la excitación de los electrones de Fe^{+3} a la banda de conducción y a la banda de valencia generando así por $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$ / $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+4}$ aumentando la foto-actividad del material al reducir la recombinación de las especies generadas. En contraste, Cui y col (2009) demostraron que la fotocatalisis puede disminuir al sobrepasar una cierta concentración de hierro debido a la recombinación con las especies foto-generadas (e^-/h^+).

En las distintas condiciones donde hubo hemólisis tras la interacción de $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ se pudo observar, en general, un aumento en el porcentaje de hemólisis con el dopaje del 3% pero al 5% disminuyó (Fig. 23), lo cual podría explicarse debido a que $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 3% presentó mayor estabilidad en SSF (90.14 mV) que $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ 5% (5.54 mV), así como a la recombinación de los portadores foto-generados antes de inducir una reacción foto-catalítica sobre la superficie del semiconductor al aumentar la concentración de Fe^{+3} en el nano-material (Mendive et al, 2011). Otro de los análisis fundamentales para determinar la toxicidad de $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ es la influencia de los iones que se pueden desprender del material en solución. Los resultados obtenidos por espectrofotometría de absorción atómica demostraron la ausencia de hierro en solución, tanto en los controles como en las muestras tratadas con $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$, lo que supone el aumento de hemólisis por la acción foto-catalítica.

Por lo tanto, mediante las pruebas *in vitro* podemos argumentar de la inocuidad de los nano-materiales analizados, ya que la ASTM F 756-08 (Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials) considera como material seguro aquél que presente un porcentaje de actividad hemolítica menor de 2%. La tabla 6 muestra la concentración de los NMs que generó el 2% de hemólisis. Respecto a los NMs de TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ se necesita una concentración mayor de 1.0 mg/mL para ocasionar el 2% de hemólisis, por lo que se pueden considerar materiales seguros no hemolíticos a estas concentraciones. Por otro lado, el $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ no se puede considerar como un material seguro a estas concentraciones ya que produjo hemólisis mayores del 2% a la concentración más baja (tabla 6).

Los nano-materiales de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ presentaron un fenómeno diferente a los materiales de TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$, ya que en todas las condiciones y a partir de la

concentración más baja hubo hemólisis (figuras 19-21). En efecto, la figura 24 muestra la relación dosis respuesta de los materiales dopados con plata, donde a concentraciones de 1.0 mg/mL la hemólisis es de casi del 100%. Además, bajo las diferentes condiciones estudiadas, en 1.0 mg/mL se produjo daño a la membrana de los eritrocitos al ser incubados con TiO₂-Ag. Si comparamos lo observado con TiO₂ y TiO₂-Fe⁺³, los cuáles mostraron no ser hemolíticos, podemos argumentar que el daño causado por TiO₂-Ag es debido principalmente a la plata (figura 24).

Respecto a las variables analizadas, se observó que la condición donde todos los materiales produjeron actividad hemolítica fue a 24°C en eritrocitos sin presencia de plasma (figura 25). La temperatura óptima para la actividad enzimática es a 37°C, por lo que al disminuir la temperatura la actividad enzimática disminuye y su acción protectora también disminuye, pudiendo generar un mayor daño. La importancia de realizar los estudios en las dos condiciones de muestra (sin plasma y sangre completa) es debido a que por un lado la sangre completa presenta todas las condiciones de protección, mientras que los eritrocitos lavados interactúan directamente con la nano-partícula, en donde se presenta condiciones de mayor susceptibilidad ya que al no presentar ADN o ARN para la síntesis de enzimas y proteínas de estrés, la actividad de las enzimas disminuye tras la exposición a algún agente tóxico e incluso por el tiempo (Gordon et al, 2013). Por lo tanto, RBC presenta un comportamiento fisiológico diferente como las funciones de regulación contra los efectos dañinos de células producidas por el estrés oxidativo y la defensa de los anticuerpos en su membrana celular. Tanto los materiales de TiO₂ y TiO₂-Fe⁺³ no presentaron actividad hemolítica al incubarlas en sangre completa (figuras 22 y 23). Este fenómeno puede ser debido a que la sangre completa presenta un comportamiento fisiológico con las funciones de respuesta celular como son: blindaje de metales por proteínas (metalotioneínas), presencia de vitaminas, principalmente la C y E, enzimas oxidantes y moléculas opzonizantes (anticuerpos, y complemento principalmente) (May et al, 2008; Wolfgang et al, 2003). Además, Föller y col (2013) demostraron en un modelo de rata *gclm^{-/-}* (deficiente de GHS), el efecto protector de la Vitamina E al prevenir el aumento de hemólisis ocasionado por el aumento de calcio intracelular, activación de canales iónicos y por último eriptosis.

Como ya se señaló, los resultados obtenidos del TiO₂ y TiO₂-Ag sugieren que el daño producido en los eritrocitos es producido por la plata y no por el TiO₂, ya

que el grado de hemólisis que éste presenta está dentro del rango de materiales seguros según la ASTM-F 756-08 (tabla 6), mientras que la actividad hemolítica presentada por los materiales de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ fue muy alta, llegando a ser hasta del 97% (Fig. 24).

Al comparar las condiciones de luz de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ se observaron resultados similares a los obtenidos al incubar las muestras en luz visible y oscuridad, en todos los porcentajes de plata. Por lo expuesto anteriormente, se esperaría que en condiciones de luz se presentara mayor grado de hemólisis debido a la influencia de Ag en el material semiconductor. Pan Xubin y col. (2010) demostraron que la disminución del ancho de banda prohibida (GAP) del TiO_2 , al ser dopado con plata, promueve la formación de especies reactivas de oxígeno bajo condiciones de luz visible, las cuales pueden interactuar con la membrana celular y otros componentes de las células (aminoácidos, proteínas y lípidos) resultando en peroxidación lipídica, inactivación de proteínas, daño al ADN y estructuras intracelulares llevando a la muerte celular y, en este caso, la hemólisis del eritrocito. En contraste, la actividad hemolítica de este nano-material (a pesar de que aumentó tras la incubación en luz visible) no presentó una gran diferencia en condiciones de luz que de oscuridad (Fig. 24). Estos resultados sugieren que el daño producido no se debe directamente a la acción foto-catalítica del nano-material, como en el caso del $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ (discutido anteriormente), sino a las propiedades físico-químicas de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (I-Lun Hsiao et al, 2011) y a la liberación de iones Ag^+ encontrados en solución (tabla 7). En la presencia de ambientes acuosos, la plata metálica (Ag^0) es oxidada, resultando en la liberación de Ag^+ . Este proceso de oxidación es lento y depende de las propiedades como el tamaño y revestimiento de la NPs, así como las condiciones del medio (Behra et al, 2013). Estos iones pueden unirse a GSH, metalotioneína y proteínas que contienen cisteína así a las proteínas de membrana y ADN produciendo desnaturalización de proteínas, depleción de GSH y daño directo e indirecto al ADN.

Respecto a la cristalinidad del material, debe señalarse que conforme aumenta el dopaje con plata disminuye la cristalinidad del material (figura 12). Traversa y col (2001) observaron el mismo efecto al sintetizar $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ a través de un proceso sol-gel aumentando la cantidad de Ag en el material, a diferentes temperaturas de calcinación. Respecto a la estabilidad de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ en el medio, el dopaje al 0.5% presentó mayor estabilidad (+81.94 eV) que al 1.5% y 2.5% (+5.64 eV) y el tamaño

de la partícula secundaria disminuyó conforme aumentaba el dopaje, aunque no se observó una diferencia significativa (figura 13). Como se mencionó anteriormente, los análisis de TiO₂-Ag por espectrofotometría de absorción atómica arrojaron la presencia de Ag⁺ en solución, observándose que no hay diferencia significativa en la concentración de iones en solución de los tres porcentajes de dopaje, por lo tanto, el dopaje con Ag al 0.5% presenta mayor porcentaje de iones en solución respecto a la plata en el NMs. (figura 28). Hadrup y col (2014) sugirieron que la toxicidad de los nano-materiales es debida a los iones liberados en solución. Al respecto, otros investigadores opinan que las nano-partículas metálicas por sí mismas, los iones que liberan y sus nano-metalomas pueden interactuar con elementos estructurales de las células alterando con ello la homeostasis y produciendo efectos biológicos adversos (Benetti et al, 2014).

En los tres porcentajes de plata, el TiO₂-Ag al 0.5% fue el material que presentó mayor actividad hemolítica (Figura 25), tanto a la más baja concentración (0.1mg/mL) como a la más alta (1.0 mg/mL) mientras que TiO₂-Ag al 2.5% presentó menor actividad hemolítica. Por lo expuesto anteriormente, se observa que la diferencia en la toxicidad entre los diferentes dopajes de TiO₂-Ag puede ser debido a que conforme aumenta el dopaje, la cristalinidad (Fig. 12) y lixiviación de iones en solución es menor (Fig. 28). La lixiviación de iones va a depender del tamaño de la NPs, superficie, cristalinidad, concentración, uniones intermoleculares y agente reductor (Kittler et al, 2010). El análisis por difracción de rayos-X de TiO₂-Ag 0.5% (Fig.12-A) mostró que la fase del material es anatasa, mientras que, en los NMs TiO₂-Ag 1.5% y TiO₂-Ag 2.5% la cristalinidad del material se vio afectada al incrementar el dopaje con plata, observando menor cristalinidad que señalan el carácter amorfo de la titania. Aihua Sun y colaboradores (2005) observaron que la disociación es dependiente del tamaño, cristalinidad y acción fotocatalítica del TiO₂. Respecto al tamaño de los tres NMs de TiO₂-Ag, es conveniente realizar un análisis por microscopia electrónica de transmisión para determinar el tamaño de la plata en los NMs y analizar la influencia de éste en el carácter tóxico de los NMs.

Respecto a las diferentes variables analizadas *in vitro*, a 37°C se observó una disminución de la concentración de Ag⁺ en solución (Fig. 28), lo cual sugiere una interacción de la plata con los eritrocitos, proteínas y componentes celulares, aumentando el daño celular. Lo anterior concuerda con las pruebas de hemólisis en las cuáles la actividad hemolítica fue mayor a 37°C que a 24°C, en la misma

condición. Como se mencionó anteriormente, la temperatura óptima para la actividad de enzimas, proteínas y componentes celulares es a temperatura corporal (37°C). En este contexto, Anselme y col (2010) al analizar el modo de interacción de las células con sustratos a nano-escala y el efecto del tamaño y la morfología de estas partículas sobre la respuesta celular, postulan que las interacciones sustrato-célula son mediadas por proteínas que adsorben al sustrato. Así, se podría favorecer la interacción de las nano-partículas con la membrana y/o su entrada al interior de la célula en donde podrían enlazarse con estructuras como las proteínas del citoesqueleto. Esto puede modificar el ambiente intracelular y activar canales iónicos permitiendo la entrada de Na^+ y salida de K^+ , lo que produce hemólisis (a través del rompimiento de la célula por la entrada de agua) o eriptosis a partir de la entrada de Ca^{+2} en la célula (Föller et al, 2013).

Lo anterior se comprobó al analizar los eritrocitos por SEM luego de su exposición a $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (Fig. 32) observándose presencia de plata (Fig. 33-A y 33-C) pero no de Ti u O en la muestra, tras el análisis por EDX del material (Fig. 33-B y 33-D). Además, se observaron eritrocitos hipotónicos (Fig. 32-E), lo que sugiere la alteración en los canales iónicos y mayor entrada de Na^+ en la célula, así como eritrocitos con daño en su membrana (Fig. 32-C y 32-D). El daño observado en los eritrocitos (figura 32-D) puede ser indicio de que el eritrocito está en proceso de eriptosis. En este proceso, el daño puede ser debido a estrés energético (depleción de ATP), estrés oxidativo (depleción de GSH) o choque osmótico. Esto estimula la formación de prostaglandina E2 mediante la activación de la ciclooxigenasa, lo que a su vez activa los canales de Ca^{++} y aumenta la entrada de este catión a la célula. El aumento de concentración de Ca^{++} citosólico provoca la salida de K^+ , Cl^- y H_2O con la posterior contracción del eritrocito y externalización de fosfatidilserina (fosfolípido) en la superficie de la membrana, lo cual es reconocido y degradado por los macrófagos. El encogimiento del eritrocito y la exposición de fosfatidilserina (eriptosis) mimetiza en los eritrocitos el proceso de apoptosis de las células nucleadas (Lang et al, 2005).

Análisis *in vivo*

El hígado ha sido considerado como uno de los principales órgano blanco tras la absorción de TiO₂-NPs (Xu et al, 2013; Chen et al, 2008; Fabian et al, 2008), las NPs pueden interaccionar de una manera directa ocasionando diferentes formas de daño membranal (Hackenberg et al, 2010), mitocondrial (Freyre et al, 2011) y al ADN (Hamzeh et al, 2013); o de manera indirecta a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (Curtis et al, 2006) y reacciones inflamatorias (Kermanizadeh Ail et al, 2013). Debido a lo anterior y a la importancia del hígado en la desintoxicación y su papel en el metabolismo y homeostasis en el organismo, se analizó el daño celular *in vivo* tras una exposición aguda y sub-aguda a NPs de TiO₂, TiO₂-Fe⁺³ y TiO₂-Ag en ratas Wistar macho a través de marcadores bioquímicos de daño hepático y análisis morfológico.

La prueba de toxicidad aguda se realizó con una dosis baja (5mg/kg), la cual es suficientemente alta para detectarse cuantitativamente en los diferentes órganos una vez distribuida y suficientemente baja para observar síntomas tóxicos (Fabian et al, 2008). Nuestros resultados obtenidos de la prueba de toxicidad aguda *in vivo* muestran que, una dosis intravenosa baja de TiO₂, pueden incrementar la actividad enzimática de AST y ALT, principalmente al día 7 observando un decremento al día 14 de tratamiento (figura 35-A, 35-B) y disminución en la síntesis de proteínas (figura 35-D, 35-E, 35-F). Ambas enzimas (AST y ALT) se encuentran en el citosol y cantidades elevadas en suero, indican el daño de la membrana celular de los hepatocitos (principalmente por el incremento de la concentración de ALT ya que es específica de daño hepático). El daño a la membrana por TiO₂-NPs se ha relacionado a la inducción del estrés oxidativo debido a la formación de ROS los cuáles una vez que han sobrepasado los sistemas antioxidantes de defensa causan daño a las membranas celulares tras la oxidación de lípidos y proteínas produciendo peroxidación lipídica (Nel,2006). Varias investigaciones han demostrado el aumento de ROS tras la administración de TiO₂ (anatasa) y disminución en los niveles de antioxidantes celulares (Cui et al, 2010). Na Li y colaboradores (2009) observaron que tras una administración única de 50 mg/kg de TiO₂ (anatasa, 5nm) induce apoptosis en los hepatocitos debido al aumento y acumulación de ROS.

La toxicidad de las NPs no sólo está determinada por el tamaño sino también por la fase cristalina del TiO_2 , formación de aglomerados, estabilidad y carga superficial (Aillon et al, 2009). Braydich-Stolle y colaboradores (2011) observaron que la forma cristalina del material puede ser un factor determinante en el tipo de muerte celular por TiO_2 observando que rutilo induce muerte celular por apoptosis, mientras que anatasa induce necrosis celular. Lo anterior concuerda con nuestros resultados al observar un aumento en los niveles de AST y ALT por TiO_2 (anatasa). Por otro lado, TiO_2 mostró estabilidad en SSF con una carga superficial positiva. Yu T. y colaboradores (2011) observaron que la carga superficial es determinante en el daño a la membrana celular, observando una mayor interacción con la membrana plasmática e internalización de NPs con carga positiva en las células que NPs con carga negativa (Harush-Frenkel et al., 2008; Osaka et al., 2009). Investigaciones han mostrado que la toxicidad debe ser evaluada respecto al tamaño de la NPs secundaria formada en el medio y no al tamaño original de la NPs (Hussain, 2009). En SSF TiO_2 presentó un radio hidrodinámico de 774 nm lo que reduciría la internalización de NPs individuales en la célula. De igual manera, la difusión de las NPs va disminuyendo conforme aumenta el tamaño (Kato et al, 2009), favoreciendo así la acumulación de NMs en el hígado.

Las NPs de TiO_2 disminuyeron significativamente la concentración plasmática de proteínas totales 1, 7 y 14 días después de su administración a las ratas; además, la concentración de albúmina disminuyó a los 7 y 14 días post tratamiento. Este fenómeno también fue observado con la administración de NPs de $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ya que la concentración plasmática de proteínas totales disminuyó significativamente a los 14 días. Además, la bilirrubina total aumentó en las ratas tratadas con NPs de TiO_2 (1 y 7 días post tratamiento), $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ (a los 7 días de la exposición) y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (1 y 7 días post tratamiento). Las proteínas totales (albúmina y globulinas) son sintetizadas en el hígado y desempeñan funciones importantes en la homeostasis corporal, ejemplo: la albúmina retiene líquidos en los vasos sanguíneos y transporta fármacos, mientras que las globulinas son parte importante del sistema inmunitario. De manera particular, la albúmina en plasma es una prueba útil para valorar la función del hígado. La disminución de la concentración de albúmina en la sangre se puede relacionar con daño hepático o con daño renal por glomerulonefritis (Limdi and Hyde, 2003; Landry and Bazari, 2011). Los datos anteriormente descritos así como los incrementos de las transaminasas séricas

apoyan el hecho de que las NPs estudiadas pueden dañar la función e integridad del hígado.

Asimismo, las NPs de TiO_2 indujeron un aumento significativo en la concentración sanguínea de bilirrubina total (1 y 7 días post tratamiento) y bilirrubina directa (7 días posteriores a la administración de las NPs). En este contexto, las NPs de $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ disminuyeron la concentración de bilirrubina total y bilirrubina directa (a los 7 días), aunque a los 14 días la bilirrubina total aumentó significativamente; a su vez, las NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ aumentaron la concentración de bilirrubina total a las 24 horas del tratamiento, pero a los 7 días se presentó un decremento significativo, respecto a la concentración sanguínea de bilirrubina directa estas NPs indujeron incrementos significativos a los días 1 y 14 post tratamiento.

Debe señalarse que la bilirrubina se origina principalmente a partir de la lisis de eritrocitos en el sistema reticoendotelial. En efecto, diariamente una pequeña cantidad de glóbulos rojos viejos es reemplazada por glóbulos nuevos. Por lo tanto, la bilirrubina (pigmento amarillo característico del grupo hemo) es un residuo de la eliminación de eritrocitos viejos. El hígado contribuye a conjuguar la bilirrubina con el ácido glucurónico (bilirrubina directa) y luego la secreta en la bilis para que pueda ser eliminada con las heces fecales. La bilirrubina sérica generalmente se encuentra en su forma no conjugada y refleja un equilibrio entre su producción y la excreción hepatobiliar. La producción de bilirrubina se incrementa con la hemólisis. Muchos fármacos o xenobióticos pueden alterar los niveles de bilirrubina en sangre. La hiperbilirrubinemia generalmente se presenta durante el daño al parénquima hepático y en la obstrucción del flujo de bilis en el colédoco (Limdi and hyde, 2003).

Como ya se señaló, estudios *in vitro* hechos con eritrocitos humanos reportan la capacidad hemolítica de las NPs de TiO_2 caracterizada por esferocitosis y equinocitosis; además, el análisis de microscopía de fuerza atómica reveló la interacción entre las NPs de TiO_2 con la hemoglobina (Ghosh et al, 2013). Asimismo, en estudios de toxicidad aguda realizados con ratones que fueron inyectados (vía intravenosa) con una sola dosis de NPs de TiO_2 , en valores crecientes (140 a 1387 mg/Kg), a los 14 días posteriores al tratamiento se encontró: la muerte de ratones con las dosis mayores, incremento en las células blancas de la sangre, aumento en el tejido del bazo, disminución de las concentraciones

sanguíneas de bilirrubina indirecta y directa, así como daño tisular en el cerebro, los pulmones, el bazo, el hígado y los riñones (Jiaying et al, 2013).

Muchas formas de lesión hepática siguen una distribución zonal debido al aporte sanguíneo que llega al espacio portal (zona 1) irrigando los hepatocitos con una dirección hacia las venas centrilobulillares (zona 3). Nuestros resultados mostraron cambios morfológicos caracterizados por degeneración hidrópica en la zona 1 del hepatocito (figura 38-C, 38-D) tras la administración de 5 mg/kg de TiO₂. Este tipo de lesión celular puede ser reversible una vez eliminadas las NPs.

La información sobre la toxicidad sub-aguda y crónica de NPs es escasa, por lo que este estudio es de suma interés para observar la respuesta de TiO₂ NPs *in vivo*. Exposiciones sub-agudas pueden culminar en daños irreversibles para las células conduciendo a necrosis celular, fibrosis y cáncer (Heinrich et al., 1995). Nuestros resultados mostraron un incremento en los niveles plasmáticos de AST, ALT, disminución de bilirrubinas (tanto directa como indirecta), proteínas totales y albúmina después de 56 días de tratamiento con TiO₂ (figura 37). Un aumento simultáneo de las enzimas AST y ALT indica procesos de necrosis hepatocelular. La relación ALT/AST nos da información sobre la magnitud del daño celular debido a que ALT se encuentra sólo en citoplasma, mientras que AST se encuentra tanto en el citoplasma como en la mitocondria. En este caso la relación ALT/AST >1.0 el daño celular es difuso con ruptura de membrana celular y compromiso citoplasmático, mientras que valores <1.0 el compromiso necrótico es más severo debido a que representa un daño tanto en la membrana plasmática como en la membrana mitocondrial. En los dos grupos tratados la relación ALT/AST fue <1.0 (figura 37-A, 37-B) lo que nos indica un daño más profundo ocasionado tanto por la interacción directa como indirecta de las NPs con las membranas celulares, así como la posible entrada de las NPs al interior de la célula y/o la generación de ROS. Cui y colaboradores (2010) observaron que tras la administración consecutiva de 10 y 50 mg/kg por 60 días, TiO₂ (anatasa, 7 nm) genera peroxidación lipídica tras un desbalance en el sistema oxidante/antioxidante al aumentar los niveles de GSH, metalotioneína, transferrina, SOD, CAT y producción de malondialdehído. Sin embargo, no observaron cambios con el control al administrar 5 mg/kg.

El estudio histológico del grupo tratado con TiO_2 , mostró degeneración hidrópica en la zona 1 del hepatocito (figura 39-C, 39-D) al igual que el tratamiento agudo (figura 38-C, 38-D) sin la infiltración de células de inflamación. Este tipo de lesión, como ya se mencionó, puede ser reversible una vez retirado el estímulo, pero si éste continúa, puede conducir a procesos de tipo irreversible (necrosis o apoptosis, inflamación, fibrosis, cirrosis). Es indispensable realizar un estudio crónico de la exposición a TiO_2 -NPs evaluando parámetros de lesión celular, marcadores tumorales y eliminación de TiO_2 . Tras la administración intravenosa de 1 mg/kg de TiO_2 , este se elimina rápidamente de la sangre (5-15 min) hacia el hígado, acumulándose hasta por 30 días con su posterior eliminación por los riñones (Shinohara et al, 2014), aumentando la posible interacción entre el Ti^{+4} y el ADN con el grupo fosfato y los átomos de nitrógeno de los pares de bases del ADN (Na Li et al, 2010) alterando la estructura secundaria del ADN. Por lo anterior, una acumulación del TiO_2 puede culminar en genotoxicidad y mutaciones del ADN.

Respecto al grupo tratado con $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$, nuestros resultados mostraron que, una dosis intravenosa baja, pueden incrementar la actividad enzimática de AST (figura 35-A) y disminuir la síntesis de proteínas (figura 35-D, 35-E, 35-F). La albúmina representa alrededor del 60% de las proteínas sintetizadas por el hígado, siendo responsable del 70% de la presión osmótica del plasma. Una de sus principales funciones es la unión y transporte de diferentes compuestos, como la bilirrubina y algunos tóxicos hacia el hígado para su procesamiento y excreción. Su disminución puede ser debida a factores como malnutrición y deshidratación y daño directo o indirecto a los hepatocitos. Después de 24 horas de tratamiento, se observó un aumento en la concentración de proteínas totales lo cual sugiere el aumento en la síntesis de albúmina y otras proteínas sintetizadas en el hígado para el transporte de $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ al hígado. Estudios *in vivo* han demostrado que un aumento en la concentración de hierro en plasma, resulta en el incremento de la expresión de hepcidina en hígado (De Domeneico, 2007). La hepcidina es una hormona peptídica producida por el hígado, responsable de regular el metabolismo y absorción intestinal del hierro así como regular la saturación de la transferrina. Un aumento en concentraciones de hierro en plasma, estimula la liberación de hepcidina inhibiendo la liberación de hierro por los hepatocitos, saturación de la transferrina y almacenamiento de hierro en el hígado (Nemeth et al, 2004). Ya que la transferrina posee dos sitios de unión para el hierro férrico (Fe^{+3}), esta proteína

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

juega un papel importante para proteger a los tejidos del daño ocasionado por los iones hierros liberados del NMs $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$, debido a la generación de ROS (a través de la reacción de Fenton o Haber Weiss). A pesar de que en nuestro estudio no se observaron iones hierro en SSF, interacciones y propiedades intrínsecas del organismo, pueden llevar a la lixiviación de estos. La enzima AST se encuentra en el citosol de las células del hígado, riñón, corazón y músculo principalmente, por lo que el incremento de esta enzima puede deberse a alteraciones extra-hepáticas producidas por $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$. Después del hígado, los órganos donde se ha encontrado distribuidas $\text{TiO}_2\text{-NPs}$ han sido en bazo, pulmones, riñones y corazón (Shinohara et al, 2014).

$\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ presentó estabilidad en el medio (SSF), carga positiva, radio hidrodinámico de 850 nm, así como fase cristalina anatasa. Como ya se discutió anteriormente, la estabilidad y carga positiva lleva a una mayor interacción y entrada de las NPs con las células, pero de igual manera, el tamaño de la NPs secundaria de $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ puede llevar a un mayor reconocimiento por las células fagocíticas mononucleares para su eliminación, las cuales están localizadas principalmente en hígado, bazo, pulmones y médula ósea (Opanasopit et al, 2002).

A través del análisis histológico se observó un aumento en el núcleo celular, degeneración hidrópica y degeneración balonzante (grumos irregulares en citoplasma con grandes espacios vacíos) (figura 38-E, 38-F). Varias lesiones al hígado de tipo tóxico y/o inmunitario pueden hacer que los hepatocitos adopten una degeneración balonzante, siendo una de las respuestas de lesión más comunes de lesión hepática aguda, la cuál puede ser reversible.

Debido a la exposición constante de los seres humanos con las NPs, es importante la evaluación a exposiciones crónicas de los NMs. El grupo tratado con $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ tras un tratamiento sub-agudo con dosis repetidas de NPs, mostraron un comportamiento similar al grupo tratado con TiO_2 observando un incremento en los niveles séricos de AST, ALT, disminución de bilirrubinas (tanto directa como indirecta), proteínas totales y albúmina. Morfológicamente se observaron células con un aumento del tamaño del núcleo celular, degeneración hidrópica vacuolar y balonzante, un signo de lesión reversible. Según la Organización Mundial de la Salud, una dosis de 5 mg/kg administrada a ratas, equivaldría a 150 mg de $\text{TiO}_2\text{-NPs}$, la cual fue administrada directamente en sangre observando un peor escenario al tener un 100% de absorción, distribuyéndose a diferentes sitios

blancos. Transcurridos 29 días tras 4 dosis de 5 mg/kg, algunas sustancias pueden presentar efectos inmediatos de daño con la activación de mecanismos celulares y la subsecuente adaptación a la sustancia. Varios estudios han demostrado la acumulación de TiO_2 en hígado mostrando una baja excreción (Shinohara, 2014), esta acumulación puede aumentar la interacción y daño de TiO_2 .

A comparación de TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$, las NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ utilizadas en el estudio *in vivo* presentaron una fase amorfa así como lixiviación de iones Ag^+ en SSF por lo que la toxicidad estaría influenciada principalmente por los iones Ag^+ disueltos que por el TiO_2 . Varios estudios han demostrado que al estar en una fase cristalina anatasa, TiO_2 presenta una mayor toxicidad (Sayes et al, 2006; Braydich-Stolle et al, 2009) que en su fase amorfa (Johnston et al, 2000). La interacción de las NPs y las células está determinado por la carga superficial y las fuerzas de unión a estas (van del Waals, hidrofóbicas, hidrofílicas, estructurales o estéricas) (Patil et al., 2007). $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ presentó un tamaño de NPs secundaria de 754 nm con carga positiva, lo que implicaría una disminución en la difusión de la NPs por los tejidos aumentando la interacción con proteínas y membranas celulares, así como un reconocimiento fagocítico y reduciendo la entrada de NPs a través de la membrana celular.

Nuestros resultados *in vivo* mostraron que, una dosis intravenosa baja de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, puede incrementar la actividad enzimática de las transaminasas (AST y ALT), disminución en la síntesis de proteínas y aumento en la concentración de bilirrubina directa. El estudio histológico mostró células con grumos irregulares en el citoplasma con grandes espacios vacíos así como degeneración hidrópica (figura 38-G, 38-H). El daño ocasionado, puede estar dado por el efecto de los Ag^+ liberados en solución, los cuales pueden interactuar directamente con la membrana biológica produciendo peroxidación lipídica, unirse a proteínas ricas en cisteína como el GSH y metalotioneina, aumentar el estrés oxidativo, daño al ADN, alteración de la homeostasis del calcio y apoptosis o necrosis celular. De acuerdo a los resultados observados, $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ocasiona necrosis celular con la liberación de AST y ALT a la sangre.

Como ya se mencionó anteriormente, la producción de ROS ha sido el principal y más estudiado mecanismo de daño celular ocasionado por $\text{TiO}_2\text{-NPs}$. Es bien conocido que los metales pueden interactuar con diferentes compuestos cuya composición química y/o dosis es la responsable del grado de daño celular. En el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

caso de metales, como hierro y cobre, la toxicidad es debida a un incremento en las concentraciones de estos metales esenciales para el organismo, a través de reacciones redox con la formación de radicales libres. En el caso de la plata, su toxicidad se da a través de la depleción del glutatión, desnaturalización de proteínas con grupo sulfhidrilo aumentando en la concentración de ROS y unión a proteínas plasmáticas. Una exposición crónica a NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ puede llevar a argiria, ya que *in vivo*, los Ag^+ disueltos en solución pueden ser transformados intracelularmente a especies insolubles de plata (Cl^- , S^{2-} y compuestos orgánicos con grupo $-\text{SH}$) siendo así almacenadas con la posterior formación de compuestos granulados, dando un color azul grisáceo a las células y tejidos (Bachler et al, 2013).

A la fecha se tiene muy poca información sobre el papel de la inmunidad mediada por células en la protección contra las nano-partículas, sin embargo investigaciones han demostrado que nano-partículas de TiO_2 pueden promover la expresión de diferentes citocinas *in vivo* e *in vitro* en diferentes modelos biológicos (Kermanizaden et al, 2013; Kobayashi et al, 2009; Grassian et al 2007). Para confirmar el rol de los procesos inflamatorios en la toxicidad mediada por las nano-partículas de TiO_2 , $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, se determinó la concentración de mediadores de la inmunidad innata ($\text{TNF-}\alpha$, IL-10, IL-6 e $\text{INF-}\gamma$) y adaptativa (IL-2, IL-6 e $\text{INF-}\gamma$).

En el caso de los grupos tratados con una dosis única de nano-partículas de TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$, éstos presentaron un comportamiento similar en los niveles séricos de las diferentes citocinas analizadas (figura 40), lo que sugiere que la fase cristalina pudiera determinar el tipo de respuesta inmune ya que estos dos NMs presentaron fase anatasa. Clément y colaboradores observaron que bajo la estructura cristalina de rutilo, TiO_2 forma mayor aglomeración produciendo menores efectos en los organismos biológicos que TiO_2 en fase anatasa, lo que aumentaría la activación de la primera línea de defensa (células fagocíticas). La concentración de $\text{INF-}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$ aumentó principalmente al día 14 de tratamiento (figura 41), mientras que las citocinas IL-2, IL-6 e IL-10 no presentaron diferencia con el control. Ma Linglan y col (2009) observaron un aumento en los niveles plasmáticos de IL-10, IL-6 y $\text{TNF-}\alpha$ a los 14 días de tratamiento tras una inyección peritoneal de 5 mg/kg de TiO_2 (5 nm) en ratas Wistar. En contraste, las NPs de TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$

no dieron lugar a la presencia de niveles altos de IL-10 (figura 40-C). Lo anterior puede ser debido a que el INF- γ inhibe la proliferación de las células colaboradoras Th2, principales productoras de IL-10. Sierra-Puente y col (2009) demostraron que una baja regulación temprana en la expresión de IL-10, es determinante en la inducción de la no-regulación de la producción de INF- γ y TNF- α . La no-regulación en la producción de INF- γ y TNF- α , puede llevar a un daño en el hígado, (Ando et al, 1993; Chisari et al, 1995) debido a la respuesta inflamatoria ligada a la producción de TNF- α (Itoh et al, 1999; Shields et al, 1999).

El INF- γ participa tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa. El INF- γ puede ser producido por macrófagos en respuesta al reconocimiento de un compuesto desconocido (inmunidad innata) o ser secretado, principalmente por las células T CD4⁺ de la subpoblación Th1 y células citocidas naturales (NK), tras el reconocimiento del antígeno (inmunidad adaptativa). El INF- γ proporciona protección a través de la activación de neutrófilos y macrófagos y aumenta la síntesis de TNF- α . El TNF- α actúa sobre las células endoteliales vasculares reclutando neutrófilos y monocitos y estimulando la producción de moléculas de adhesión para la unión de los leucocitos en las células endoteliales. A su vez el INF- γ potencia la función de los macrófagos activados, los cuáles producen intermediarios reactivos de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO). Así también, INF- γ estimula la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) del tipo I y II y coestimuladores de las células presentadoras de antígeno.

Los niveles elevados en suero de TNF- α debido a la exposición con NPs, puede producir efectos a nivel sistémico estimulando: 1) síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos (proteína C reactiva, proteína amiloide sérica, componente sérico P y alfa-1 glicoproteína), 2) catabolismo muscular, 3) actividad inflamatoria sistémica, 4) trombosis ocasionando taponamientos vasculares por aumento de células inflamatorias (macrófagos y neutrófilos) llevando a necrosis tumorales y 4) hipoglucemia.

Las citocinas IL-2 e IL-6 juegan un papel determinante en la inmunidad adaptativa a través de la activación y proliferación de células B, por lo tanto al no observar un aumento de IL-2 e IL-6, la reacción inmunitaria tras una exposición única a NPs de TiO₂ y TiO₂-Fe⁺³, puede estar mediada por la respuesta de las células T CD4⁺ Th1, caracterizada por la producción del INF- γ y la activación de TNF- γ responsable del daño tisular y manifestaciones sistémicas.

Respecto al tratamiento con dosis repetidas de NPs de TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ (prueba sub-aguda), sólo el grupo tratado con $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ presentó un aumento en los niveles de IL-6 (figura 42) la cual estimula la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno derivado de la inmunidad adaptativa tras el reconocimiento del antígeno.

En el caso del grupo tratado con una dosis única de NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, éste presentó un incremento significativo en los niveles de IL-10 y de TNF- α (figura 41). La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria la cual juega un papel determinante en la regulación de los procesos pro-inflamatorios. Inhibir la producción de diferentes citocinas (principalmente INF- γ) de macrófagos activados y subpoblaciones de linfocitos colaboradores Th2. Por lo tanto, la IL-10 actúa como un modulador negativo en la generación de ROS. A su vez, Ma Linglan y colaboradores (2009) demostraron que el aumento en los niveles de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1, IL-4, and IL-10) por TiO_2 resulta en daño a los hepatocitos y apoptosis. Los resultados obtenidos muestran un incremento en los niveles tanto de IL-10 como TNF- α , estando ligado al daño observado en hígado (figura 38-E y 38-F) pudiendo producir toxicidad al hígado.

Los resultados obtenidos sugieren que la expresión de las citocinas pro-inflamatorias tras la exposición a $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ son reguladas por la expresión de IL-10. Muñoz y col (2011) demostraron que concentraciones elevadas de IL-10, puede inducir a la conversión de células estelares del hígado a células miofibroblásticas llevando a un proceso exhaustivo de reparación celular. La susceptibilidad del daño celular producido tras la exposición a NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ puede ser dependiente de la respuesta de las citocinas producidas por las células

Los mecanismos por los cuales las nano-partículas pueden interaccionar con las células y/o causar daño aún no se han esclarecido ya que, el daño puede estar dado por un aumento en los mismos mecanismos de defensa natural para prevenir el daño produciendo apoptosis e inflamación en el tejido, así como interacciones directas de la nano-partículas con diferentes factores moleculares (Li Na, 2009).

A pesar de que no hay la suficiente evidencia contundente de que el TiO_2 es tóxico, varias investigaciones han mostrado los efectos adversos de éste en diferentes líneas celulares. Así también es difícil la comparación entre los diferentes estudios *in vivo*, ya que a pesar que utilizan el mismo compuesto, las características del nano-material y metodología experimental es diferente en todas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

las investigaciones. Por lo que es importante desarrollar una descripción detallada tanto del material como de las variables utilizadas en los experimentos, así como estandarizar las pruebas de toxicidad de nano-partículas. En este estudio demostramos que en las células sanguíneas, el TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ pueden ser considerados como materiales seguros no hemolíticos. Por otra parte en el hígado presentaron daño hepático temprano caracterizado por el aumento en los niveles de transaminasas, fosfatasa alcalina y disminución en la síntesis de proteínas aún a una baja dosis del NMs. Es importante realizar más estudios sobre el efecto crónico de estas nano-partículas, ya que como se observó en el estudio sub-agudo, después de 56 días de tratamiento, tras una dosis constante de NPs los niveles de enzimas aumentan y la síntesis de proteínas se ve afectada.

Así como se mencionó en el apartado anterior, las nano-partículas pueden aglomerarse una vez en el organismo y/o durante los procesos de translocación por las células. Lo anterior conlleva a cambios en las propiedades fisicoquímicas de las NPs y por tanto diferentes interacciones entre los sistemas biológicos *in vivo* e *in vitro*, por lo que la interpretación de los resultados de toxicidad de las NPs se vuelve complejo.

X. CONCLUSIONES

Se lograron alcanzar los objetivos planteados en este trabajo de investigación, evaluándose la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de materiales nano-estructurados de TiO_2 . El estudio de toxicidad *in vitro* muestra que los materiales de TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ pueden ser catalogados como materiales no hemolíticos y seguros de acuerdo a la ASMT. En contraste, los materiales dopados con plata son hemolíticos, dañando eritrocitos aún a bajas concentraciones

Se logró correlacionar las propiedades físico-químicas de los diferentes NMs con su actividad tóxica tras su interacción con células rojas y/o ratas Wistar macho. Observamos que la composición del material tiene un efecto significativo en la actividad tóxica del mismo. Nuestros resultados indican que el efecto adverso del $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ se debe a la lixiviación de iones y su interacción con biomoléculas.

El estudio de toxicidad *in vivo* muestra que una exposición crónica a nanopartículas de TiO_2 , $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ pueden ocasionar daño al hígado al disminuir la síntesis de proteínas, producir necrosis celular y activar la respuesta inflamatoria.

El efecto de los NMs, TiO_2 , $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{+3}$ y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, puede ser producido por la acumulación de NPs en el tejido y su interacción directa con los componentes celulares.

GLOSARIO

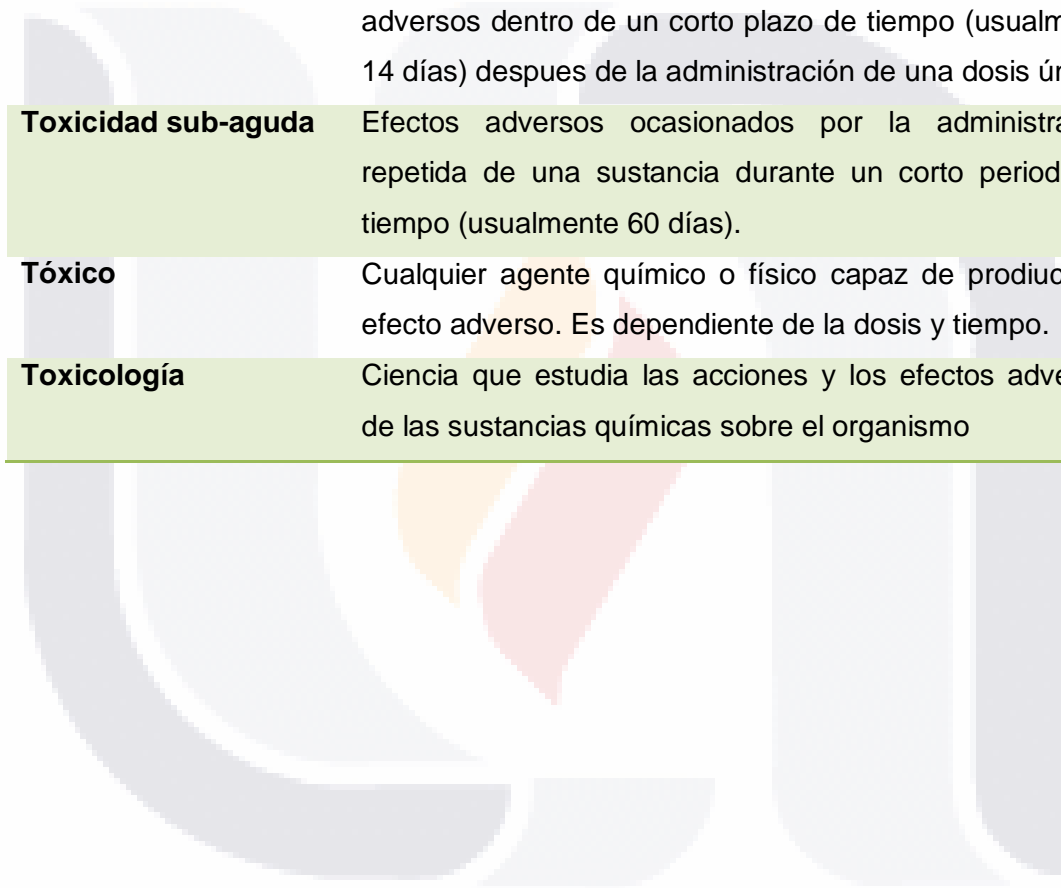
Absorción	Proceso por el cual los tóxicos cruzan las membranas entrado a l torrente sanguíneo.
Anticuerpo	Molécula glicoproteína, también denominada Ig, producida por los linfocitos B y que se une a un antígeno. Posee alto grado de especificidad y afinidad
Antígeno:	Molécula extraña que se une a un anticuerpo
Antioxidante	Sustancia que protege contra la oxidación celular.
Apoptosis:	Proceso de muerte celular programado caracterizado por la escisión del ADN, condensación, agregación del núcleo, vesiculación de la membrana plasmática y su posterior fagocitosis. No induce respuesta inflamatoria.
Argia	enfermedad causada por la ingesta o contacto prolongado de plata cuya característica principal es el un color azulado-grisáceo en la piel
Autoanticuerpo:	Anticuerpo producido en un individuo que es específico de un antígeno propio.
Bioacumulación	Aumento progresivo de la cantidad de una sustancia en una organismo o parte de él.
Biotransformación	Proceso por el cuál un compuesto externo es alterado químicamente al interactuar con un sistema biológico.
Catálisis heterogénea	Reacción que se lleva a cabo en una interfase (por ejemplo sólido-líquido)
Catalizador	Sustancia que tiene la capacidad de acelerar una reacción química
Células citocidas Naturales (NK):	Subpoblación de linfocitos que actúan en las respuestas inmunitarias innatas través de mecanismos líticos.
Células Th1	Subpoblación funcional de linfocitos T colaboradoras cuya función principal es estimular la defensa mediada por fagocitos.

Células Th2	Subpoblación funcional de linfocitos T colaboradoras cuya función principal es estimular las reacciones inmunitarias mediadas por IgE
Citocromo P450	Superfamilias de hemoproteínas con actividad enzimática monooxigenasa
Citocinas:	Proteínas producidas por diferentes células. Mediadores del sistema inmunitario.
Coloide	sustancia formada por diminutas partículas suspendidas de manera estable entre moléculas de otra materia
Dopaje	
Dosis	Cantidad de sustancia administrada o absorbida por un individuo en proporción a su peso (mg/kg)
Dosis-efecto	Asociación entre la concentración de exposición y la magnitud del cambio gradual resultante
ELISA	Es un inmunoensayo ligado a enzimas para la cuantificación de un antígeno (o anticuerpo) usando una enzima enlazada a un anticuerpo para el antígeno (anticuerpo)
Espectroscopia	conjunto de técnicas que miden la respuesta de una molécula a la aparición de energía
Estrés oxidativo	Condiciones de alteración celular y tisular por exceso de y acumulación de sustancias oxidantes y radicales libres
Exposición aguda	Exposición a corto plazo de una dosis única a una sustancia química.
Exposición Ocupacional	Incidencia de sustancias, radiaciones, etc, durante el trabajo.
Exposición Sub-aguda	Exposición continua a una sustancia química por un periodo largo de tiempo (meses)
Factor de Necrosis Tumoral (TNF):	Citocina producida principalmente por fagocitos mononucleares que estimulan el reclutamiento de neutrófilos y monocitos.
Fagocitosis:	Proceso por el que ciertas células del sistema inmunitario, engloban partículas de gran tamaño.

Foto-catálisis	Reacción a través de la cual se acelera una reacción química (catalizador) mediante la acción de la luz (foto)
Glutación	Tripeptido glutamil-cisteinil-glicina. Sintetizado en todas las células, principalmente en hígado. Protector en la desintoxicación y protección celular.
Hemólisis	Lisis de los eritrocitos con la subsecuente liberación del contenido intraeritrocitario al plasma.
In vitro	Estudio de laboratorio realizado sobre células, tejidos u órganos aislados o con sistemas sub-celulares o bioquímicos.
In vivo	Estudio realizado sobre un individuo vivo.
Inflamación:	Acumulación y activación de leucocitos y proteínas plasmáticas en el sitio de infección
Inmunidad adaptativa:	Inmunidad mediada por linfocitos
Inmunidad celular:	Inmunidad mediada por Linfocitos T
Inmunidad humoral:	Inmunidad mediada por Linfocitos B
Inmunidad Innata:	Respuesta rápida contra un agente extraño.
Inmunotoxicidad	Toxicidad del sistema inmunológico. Hipersensibilidad, inmunodeficiencia y/o proliferación no controlada
Ion	Átomo o grupo de átomos con carga eléctrica positiva o negativa.
Lixiviación	Proceso por el cual moléculas constituyentes de la disolución de sólidos migran desde la superficie de la solución a través de una capa de difusión entre la superficie de la partícula y su medio
Nano-materiales	Materiales que poseen una o más dimensiones en el rango nano-métrico (1-100 nm)
Nano-metro	Milmillonésima parte de un metro (10^{-9} m).
Nano-tecnología	Área de la nano-ciencia que estudia, diseña, fabrica y aplica materiales a base de nano-partículas
Nano-toxicología	Área de la nano-ciencia que se encarga de estudiar la toxicología de las nano-partículas en los organismos vivos y el medio ambiente.

Necrosis	Muerte celular debido a la perturbación extrema del equilibrio celular. Esta caracterizado por incremento del volumen mitocondrial y celular, y con activación de proteasas intracelulares culminando con la ruptura de la membrana celular y liberación del contenido celular que promueve una reacción inflamatoria secundaria.
Oxidación	Incremento del número de oxidación de un átomo como resultado de la pérdida de electrones
Óxido metálico	Compuesto formado tras la reacción de un metal con el oxígeno
Parénquima	Tejido conjuntivo de ciertos órganos glandulares (por ejemplo: parénquima hepático)
Radical Libre	especie química que tiene un solo electrón no apareado en un átomo; especie química con un número impar de electrones
Ratas Wistar	Ratas albinas que pertenecen a la especie <i>Rattus norvegicus</i> . Esta variedad fue desarrollada en el Instituto Wistar en 1906 para su uso en la investigación biológica y médica, y es la primera cepa de ratas desarrolladas para servir como un organismo modelo en un momento en que los laboratorios utilizaban principalmente <i>Mus musculus</i> , o el ratón común de las casas.
Reducción	Disminución en el número de oxidación de un elemento como resultado de la ganancia de electrones
Respuesta	Proporción de población expuesta a un estímulo que manifiesta un efecto concreto.
Respuesta Inmunitaria:	Respuesta colectiva y coordinada contra sustancias extrañas, mediada por las células y moléculas del sistema inmunitario
Riesgo	Probabilidad de que se produzcan efectos adversos por exposición a un agente tóxico
Semiconductor	
Síntesis	Proceso por el que se obtiene una sustancia a partir de la combinación de elementos químicos o de sustancias

	más simples
Solución salina fisiológica	Solución de 0.90% de NaCl. Es isotónica y tiene la misma presión osmótica que el plasma sanguíneo.
Suero:	Líquido libre de células que permanece cuando la sangre o el plasma forman un coágulo.
Toxicidad	Capacidad para producir daño en relación con la dosis de una sustancia administrada o absorbida.
Toxicidad aguda	Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos dentro de un corto plazo de tiempo (usualmente 14 días) después de la administración de una dosis única
Toxicidad sub-aguda	Efectos adversos ocasionados por la administración repetida de una sustancia durante un corto periodo de tiempo (usualmente 60 días).
Tóxico	Cualquier agente químico o físico capaz de producir un efecto adverso. Es dependiente de la dosis y tiempo.
Toxicología	Ciencia que estudia las acciones y los efectos adversos de las sustancias químicas sobre el organismo



BIBLIOGRAFIA

- Abe S, K. D. (2009). Time-dependence and visualization of TiO₂ and Pt particle biodistribution in mice. *J Nanosci Nanotechnol* 9, 4988-91
- Ahmed, M. H., Keyes, T. E., & Byrne, J. a. (2013). The photocatalytic inactivation effect of Ag-TiO₂ on β -amyloid peptide (1-42). *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 254, 1-11.
- Ahmed, M. H., Keyes, T. E., Byrne, J. a., Blackledge, C. W., & Hamilton, J. W. (2011). Adsorption and photocatalytic degradation of human serum albumin on TiO₂ and Ag-TiO₂ films. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 222(1), 123-131.
- Aillon, K. L., Xie, Y., El-Gendy, N., Berkland, C. J., & Forrest, M. L. (2009). Effects of nanomaterial physicochemical properties on *in vivo* toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(6), 457-66.
- Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, et al. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 1993; 178(5): 1541- 1554.
- Anselme, K., Davidson, P., Popa, a M., Giazzon, M., Liley, M., & Ploux, L. (2010). The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta Biomaterialia*,
- Aschberger, K., Micheletti, C., Sokull-Klüttgen, B., & Christensen, F. M. (2011). Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health--lessons learned from four case studies. *Environment International*, 37(6), 1143-56.
- Auffan, M. A.-Y. (2009). Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity *in vitro*. *Environmental pollution* , 1127-33
- Auffan, Mélanie, Rose, Jérôme Wiesner, Mark R Bottero, Jean-Yves. 2009. "Chemical Stability of Metallic Nanoparticles: a Parameter Controlling Their Potential Cellular Toxicity *in vitro*." *Environmental Pollution*. 1127-3
- Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Ghissassi, F. El, Cogliano, V., & International, W. H. O. (2006). Carcinogenicity of carbon black , titanium dioxide , and talc, 295-296.

- Barbara Rothen, S. S. (2006). Interaction of Fine Particles and Nanoparticles with Red cells visualized with Advanced Microscopic Techniques. *Environ. Sci. Technol*, 4353-4359
- Becker Heidi, F. Herzberg, A. Schulte, M. Kolossa. 2011. The carcinogenic potential of nanomaterials, their release from products and options for regulation them. *International Journal of Hygiene and Environmental health*. (214) 231-23
- Benetti F, Bregoli L, Olivato I, Sabbioni E: Effects of metal(loid)-based nanomaterials on essential element homeostasis: the central role of nanometallomics for nanotoxicology. *Metallomics*, 6(4): 729-747, 2014.
- Bengt Fadeel, A. E.-B. (2010). Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 362–374
- Berube, K., Balharry, D., Sexton, K., Koshy, L., Jones, T. 2007. Combustion derived nanoparticles: mechanisms of pulmonary toxicity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 1044–1050
- Bhattacharya K, D. M. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part Fibre Toxicol*, 6:17
- Bloh, J. Z., Dillert, R., & Bahnemann, D. W. (2012). Designing Optimal Metal-Doped Photocatalysts: Correlation between Photocatalytic Activity, Doping Ratio, and Particle Size. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(48), 25558–25562.
- Borm, P., Klaessig, F. C., Landry, T. D., Moudgil, B., Pauluhn, J., Thomas, K., Wood, S. 2006. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V: role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 90(1), 23–32.
- Bronwyn L. Razzaboni, P. B. (1990). Evidence of an Oxidative Mechanism for the hemolytic activity of Silica particles. *Environmental Health Perspectives*, 387-34
- Brunet, L., Lyon, D.Y., Hotze, E.M., Alvarez, P.J., Wiesner, M.R., 2009. Comparative photoactivity and antibacterial properties of C60 fullerenes and titanium dioxide nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4355–436
- Brunner, T.J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R.N., Limbach, L.K., Bruinink, A., Stark, W.J., (2006). *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to

- asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental Science and Technology*
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17.
- C.J. Brinker, G. S. (1990). *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. The Netherlands: Elsevier
- Chen, H. Schluessener. 2008. Nano-silver: A nano-product in medical application. *Toxicology Letters* 176, 1-12.
- Chen, J., Dong, X., Zhao, J., & Tang, G. (2009). *In vivo* acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 29(4), 330–7.
- Chisari FV & Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29–60.
- Choi, J., Reipa, V., Hitchins, V. M., Goering, P. L., & Malinauskas, R. a. (2011). Physicochemical characterization and *in vitro* hemolysis evaluation of silver nanoparticles. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 123(1), 133–43.
- Cho, W.-S., Duffin, R., Poland, C. a, Howie, S. E. M., MacNee, W., Bradley, M., Donaldson, K. (2010). Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environmental Health Perspectives*, 118(12).
- Christiane Beer, Rasmus Foldbjerg, Yuya hayashi, Duncan S. Sutherland, Herman Atrup. 2011. "Toxicity of silver nanoparticles – Nanoparticle or silver ion?" *Toxicology Letters* 208 (2012) 286-292
- Clément, L., Hurel, C., & Marmier, N. (2013). Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants - effects of size and crystalline structure. *Chemosphere*, 90(3)
- Coleman, H.M., Marquis, C.P., Scott, J.A., Chin, S.S., Amal, R., 2005. Bactericidal effects of titanium dioxide-based photocatalysts. *Chem. Eng. J.* 113, 55–63
- Cui, L., Wang, Y., Niu, M., Chen, G., & Cheng, Y. (2009). Synthesis and visible light photocatalysis of Fe-doped TiO₂ mesoporous layers deposited on hollow glass microbeads. *Journal of Solid State Chemistry*, 182(10), 2785–2790.

- Cui, Y., Gong, X., Duan, Y., Li, N., Hu, R., Liu, H., ... Hong, F. (2010). Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1-3), 874–80.
- Curtis, J., Greenberg, M., Kester, J., Phillips, S., Krieger, G., 2006. Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians. *Toxicol. Sci.* 25, 245–260
- De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin regulation: ironing out the details. *J Clin Invest* 2007; 117: 1755–8
- Deliang Chena, Q. C. (2013). Synthesis and Ag-loading-density-dependent photocatalytic activity of Ag@TiO₂ hybrid nanocrystals. *Applied Surface Science* 284, 921– 929.
- Denis FA, Hanarp P, Sutherland DS, Gold J, Mustin C, Rouxhet PG, et al. Protein adsorption on model surfaces with controlled nanotopography and chemistry. *Langmuir* 2002;18:819–28
- Di Virgilio, a L., Reigosa, M., Arnal, P. M., & Fernández Lorenzo de Mele, M. (2010). Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3), 711–8.
- Doctor, Allan., & Spinella, P. (2012). Effect of processing and storage on red blood cell function *in vivo*. *Seminars in Perinatology*, 36(4), 248–59.
- Donaldson K, Aitken R, Tran L, Stone V, Duffin R, Forrest G, Alexander A, 2006. Carbon Nanotubes: a Review of Their Properties in Relation to Pulmonary Toxicology and Workplace Safety. *Toxicological Sciences*, 92 (1) : 5-22.
- Dumas B, Biggs HG: 1971. In *Standard Methods of Clinical Chemistry Vol. 7* Academic Press New York.
- Elder, H. Yang, R. Gwiazda, X. Teng, S. Thurston, H. He, G. Oberdörster, Testing nanomaterials of unknown toxicity: an example based on platinum nanoparticles of different shapes, *Adv. Mater.* 19 (2007) 3124–3129
- Environmental Protection Agency (EPA) <http://www.epa.gov/nanoscience/>
- Fiorito S, 2007. Carbon Nanoparticles: Benefits and Risks for Human Health In *Nanotoxicology, Interactions of Nanomaterials with Biological Systems*, édité par Zhao Y, Nalwa HS, American Scientific Publishers, 2007, p 167-180.
- Föllner, M., Harris, I. S., Elia, a, John, R., Lang, F., Kavanagh, T. J., & Mak, T. W. (2013). Functional significance of glutamate-cysteine ligase modifier for

- erythrocyte survival *in vitro* and *in vivo*. *Cell Death and Differentiation*, 20(10), 1350–8.
- Freyre-Fonseca, V., Delgado-Buenrostro, N.L., Gutiérrez-Cirlos, E.B., Calderón-Torres, C.M., Cabellos-Avelar, T., Sánchez-Pérez, Y., Pinzón, E., Torres, I., Molina-Jijón, E., Zazueta, C., Pedraza-Chaverri, J., García-Cuéllar, C.M., Chirino, Y.I., 2011. Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicol. Lett.* 202, 111–119
- Fujishima, A., Rao, T.N., Tryk, D.A., 2000. Titanium dioxide photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. C* 1, 1–21
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schürch, S., Kreyling, W., Schulz, H., y otros. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ. Health Perspect.*, 1555-1560.
- Ghosh M, Chakraborty A, Mukherjee A: Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells *in vitro*. *J Appl Toxicol*, 33(10): 1097-1110, 2013.
- Goldberg, R. L. (2007). Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 18(3), 241-268.
- Gordon-Smith, T. (2013). Structure and function of red and white blood cells. *Medicine*, 41(4), 193–199.
- Grassian, V. H., O'shaughnessy, P. T., Adamcakova-Dodd, A., Pettibone, J. M., & Thorne, P. S. (2007). Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environmental Health Perspectives*, 115(3), 397–402.
- Guo, L. V. (2008). Adsorption of essential micronutrients by carbon nanotubes and the implications for nanotoxicity testing. *Small* 4, 721–727
- Hackenberg, S., Friehs, G., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Scherzed, A., Kleinsasser, N. (2010). Intracellular distribution, geno- and cytotoxic effects of nanosized titanium dioxide particles in the anatase crystal phase on human nasal mucosa cells. *Toxicology Letters*, 195(1), 9–14.
- Hadrup, N., & Lam, H. R. (2014). Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP*, 68(1), 1–7.

- Hameed Hyder MA, 2003. Nanotechnology and environment: potential applications and environmental implications of nanotechnology. <http://www.nanoforum>.
- Hamzeh, Mahsa., & Sunahara, G. I. (2013). *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. *Toxicology in Vitro* 27 , 864–873 .
- Handy Richard, Richard Owen, Eugenia Valsami-Jones. “*The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, Knowledge gaps, challenges, and future needs*” *Ecotoxicology* (2008) 17:315-325
- Hans Bouwmeester., S. Dekker, M. Noordan, W. Hagens, A. Bulder, C. Heer, S. Voorde, S. Wijnhoven, H. Marvin, A. Sips. 2009. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 53, 52-62
- Harush-Frenkel O, Rozentur E, Benita S, Altschuler Y. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules* 2008;9:435–43
- Haynes, Y.-S. L. (2010). Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity. *JACS*, 4834-48
- Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, et al. Chronic inhalation exposure of wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol* 1995;7(4):533–56
- Holister P, Roman V, Harper T, 2003. Fullerenes. *Technology White Papers*. S.I. Cientifica, 2003, 12
- IACR, I. A. (2006). IARC Titanium dioxide (Group 2B). *Monograph Eval Carcinog Risks Hum* 93, 193-276.
- I-Lun Hsiao, Y.-J. H. (2011). Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cell. *Science of the Total Environment* 409, 1219–1228
- Itoh Y, Okanoue T, Ohnishi N, et al. (1999). Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors and effects of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 94(5): 1332–1340
- J. Palomäki, P. karisola, L. Pylkkänen, K. Savolainen, h. Alenius. 2009. “*Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells*”. *Toxicology* 267, 125-131

- Jaramillo F.; Rincón A.R.; Posadas F.A. *Toxicología Básica*. Textos Universitarios-Ciencias Biomédicas, UAA-U de G-UJED, Primera Edición. 2006.
- Jiangxue Wang, Guoqiang Zhoua, Chunying Chena, Hongwei Yu, Jiangxue Wang, Y Mad, G Jia, Y Gaoa, B Li, J Suna, Y Li, F Jiao, Y Zhaoa, Z Chai. «Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration.» *Toxicology Letters*, 2007: 176–185.
- Jongdoo L., & Simanek, E. E. (2012). Triazine dendrimers as drug delivery systems: from synthesis to therapy *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(9), 826–35.
- K.W. Powers, S.C. Brown, V.B. Krishna, S.C. Wasdo, B.M. Moudgil, S.M. Roberts, Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation, *Toxicol. Sci.* 90 (2006) 296–303
- Kalbacova M, Macak JM, Schmidt-Stein F, Mierke CT, Schmuki P. «TiO₂ nanotubes: photocatalyst for cancer cell killing.» *Phys Status Solidi-R*, 2008: 94–6
- Kazuya Nakataa, A. F. (2012). TiO₂ photocatalysis: Design and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 13 , 169– 189
- Kato, H., Suzuki, M., Fujita, K., Horie, M., Endoh, S., Yoshida, Y. Kinugasa, S.(2009). Reliable size determination of nanoparticles using dynamic light scattering method for *in vitro* toxicology assessment. *Toxicology in vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 23(5), 927–34.
- Kermanizadeh, A., Pojana, G., Gaiser, B. K., Birkedal, R., Bilanicová, D., Wallin, H. Stone,V. (2013). *In vitro* assessment of engineered nanomaterials using a hepatocyte cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory cytokines and functional markers. *Nanotoxicology*, 7(3), 301–13
- Kesharwani, P., Jain, K., & Jain, N. K. (2013). Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Progress in Polymer Science*, 91.
- Kim HM, Chae WP, Chang KW, Chun S, Kim S, Jeong Y. «Composite nanofiber mats consisting of hydroxyapatite and titania for biomedical applications.» *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* , 2010: 380–7
- Kim YH, Kang YS. « Synthesis and characterization of Ag nanoparticle, Ag–TiO₂ nanoparticle and Ag–TiO₂–chitosan complex and their application to antibiosis and deodorization. .» *Mater Res Soc Symp P* , 2004: 221–6

- Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Köller, M., & Epple, M. (2010). Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. *Chemistry of Materials*, 22(16), 4548–4554.
- Kobayashi, N., Naya, M., Endoh, S., Maru, J., Yamamoto, K., & Nakanishi, J. (2009). Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: different short- and long-term post-instillation results. *Toxicology*, 264(1-2), 110–8.
- Kreyling, M. Semmler-Behnke, W. Möller, Health implications of nanoparticles, J. Nanopart. Res. 8 (2006) 543–562
- Krusik PJ, Wasserman E, Keizer PN, Morton JR, Preston KF, 1991. Radical Reactions of C60. *Science* 254 : 1183 – 118
- Krusik PJ, Wasserman E, Keizer PN, Morton JR, Preston KF, 1991. Radical Reactions of C60. *Science* 254 : 1183 – 1185
- Kui Liu, Xialu Lin, Jinshun Zhao. «Toxic effects of the interaction of titanium dioxide nanoparticles with chemicals or physical factors.» *International Journal of Nanomedicine*, 2013: 2509-2521.
- Kwon, S., Fan, M., Cooper, A.T., Yang, H., 2008. Photocatalytic Applications of Micro- and Nano-TiO₂ in Environmental Engineering. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 38, 197–226
- Lagopati, P. Kitsiou, A. Kontos P. Venieratos, E. Kotsopoulou. A.G. Kontos. 2010. Photo-induced treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide solution. *Journal of Photochemistry and photobiology A. Chemistry* 214, 215, 223.
- Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM, Lang F (2005) Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem.*15(5):195-202
- Lanone S., J. Boczkowski, Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms, *Curr. Mol. Med.* 6 (2006) 651–66
- Lee, S. P. (2010). Importance of structural information in predicting human acute toxicity from *in vitro* cytotoxicity data. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 38–48.
- Lehner, Roman, Xueya Wang, Stephan Marsch, and Patrick Hunziker. 2013. “Intelligent Nanomaterials for Medicine: Carrier Platforms and Targeting Strategies in the Context of Clinical Application.” *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine* (9)742–57.

- Lehninger Albert, Nelson, David, M. Cox. Lehninger Principles of Biochemistry, fourth edition. Illustrated. 2004
- Levy Michael. N. Luciani, D. Alloeyau, D. Elgravli, V. Deveaux, C. Pechoux, S. Chat. G. Wang, N. Vats, F. Gendron. 2011. Long term *in vivo* biotransformation of iron oxide Nanoparticles. *Biomaterials* 32, 3988-3999.
- Li Qiang Chen, B. K. (2013). Cytotoxicity of cuprous oxide nanoparticles to fish blood cells: hemolysis and internalization. *Nanopart Res* .
- Li, N., Duan, Y., Hong, M., Zheng, L., Fei, M., Zhao, X. Hong, F. (2010). Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters*, 195(2-3), 161–168
- Li, N., Ma, L., Wang, J., Zheng, L., Liu, J., Duan, Y., Xie, Y. (2009). Interaction Between Nano-Anatase TiO₂ and Liver DNA from Mice *In Vivo*. *Nanoscale Research Letters*, 5(1),
- Linsebigler, A. L., Lu, G., & Yates, J. T. (1995). Photocatalysis on TiO₂ Surfaces: Principles, Mechanisms, and Selected Results, 735–758.
- Liu, Kui, Xialu Lin, and Jinshun Zhao. 2013. “Toxic Effects of the Interaction of Titanium Dioxide Nanoparticles with Chemicals or Physical Factors.” *International Journal of Nanomedicine* 8 2509–20.
- Liu, R., Yin, L., Pu, Y., Liang, G., Zhang, J., Su, Y., Ye, B. (2009). Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intra-tracheal instillation in rats. *Progress in Natural Science*, 19(5), 573–579
- Liu, R., Zhang, X., Pu, Y., Yin, L., Li, Y., Zhang, X., Liang, G., Li, X., Zhang, J., 2010. Small- sized titanium dioxide nanoparticles mediate immunotoxicity in rat pulmonary alveolar macrophages *in vivo*. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10, 5161–5169
- Ma L, L. J. (2010). Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials* 31, 99-105.
- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., & Dusinska, M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(3), 233–78.
- May, J. M. (1998). Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte . *Frontiers in Bioscience*, 1-10.

- Medina-Ramirez Iliana, S. B. (2009). Green synthesis and characterization of polymer-stabilized silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73 , 185-191
- Mendive, C. B., Hansmann, D., Bredow, T., & Bahnemann, D. (2011). New Insights into the Mechanism of TiO₂ Photocatalysis: Thermal Processes beyond the Electron À Hole Creation, 19676–19685.
- Mohammad Mansoob Khan, S. A. (2013). Novel Ag@TiO₂ nanocomposite synthesized by electrochemically active biofilm for nonenzymatic hydrogen peroxide sensor. *Materials Science and Engineering C* 33 , 4692–4699.
- Monopoli, M.P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Bombelli, F.B., Dawson, K.A., «Physical–chemical aspects of protein corona: relevance to *in vitro* and *in vivo* biological impacts of nanoparticles.» *J. Am. Chem. Soc.* , 2011: 2525–2534.
- Monteiller, C., Tran, L., MacNee, W., Faux, S., Jones, A., Miller, B., Donaldson, K., «The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells *in vitro*: the role of surface area.» *Occup. Enviro*, 2007: 609–615
- Moran Lopez, J. L. (2012). *Los materiales nanoestructurados. Sus propiedades eb la revolucion científica y tecnológica del siglo XXI* . México: Fondo de cultura economica.
- Muller-Eberhard and Mostafa Fraig. Bioactivity of Heme and Its Containment"American Journal of Hematology 1993: 42-59-62.
- Mura, S., Hillaireau, H., Nicolas, J., Le Droumaguet, B., Gueutin, C., Zanna, S., Tsapis, N., Fattal, E. «Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells.» *Int. J. Nanomed.*, 2011: 591–2605.
- Muzquiz Ramos Elia, D. C. (2013). *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of apatite-coated magnetite nanoparticles for cancer therapy. *Mater Med*, 1035–1041
- Naahidi, M. J. (2013). Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release* 166, 182–194.
- Nemmar, A., Melghit, K., Al-Salam, S., Zia, S., Dhanasekaran, S., Attoub, S. Ali, B. H. (2011). Acute respiratory and systemic toxicity of pulmonary exposure to rutile Fe-doped TiO₂ nanorods. *Toxicology*, 279, 167–75.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*; 306: 2090-3

- Oberdorster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J,: Role of the alveolar macrophages in lung injury-Studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 97: 193-199, 1992
- Oberdörster G, O. E. (2005). Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles . *Environmental Health Perspectives*, 113 (7) , 823-839 .
- P. Somasundaran, S. Chakraborty, Q. Qiang, P. Deo, J. Wang,R. Zhang, J. Cosmet. Sci. 2004, 55, S1–S17
- Palomäki, J., Karisola, P., Pylkkänen, L., Savolainen, K., & Alenius, H. (2010). Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. *Toxicology*, 267(1-3), 125–31.
- Palomäki, J., Karisola, P., Pylkkänen, L., Savolainen, K., & Alenius, H. (2010). Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. *Toxicology*, 267(1-3), 125–31
- Patri A., T. Umbreit, J. Zheng, K. Nagashima, P. Goering, S. Francke-Carroll, E. Gordon, J. Weaver, T. Miller, N. Sadrieh, Energy dispersive X-ray analysis of titanium dioxide nanoparticle distribution after intravenous and subcutaneous injection in mice, *J. Appl. Toxicol.* 29 (2009) 662–672.
- Peralta Jose R., L. Z.-M. (2011). Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010. *Journal of Hazardous Materials* , (186) 1 -15
- Peterson GL: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, 83:346-356, 1977
- Pietropaoli AP, Frampton MW, Oberdörster G, Cox C, Huang L-S, Marder V, et al. Blood markers of coagulation and inflammation in healthy human subjects exposed to carbon ultrafine particles. In: *Effects of Air Contaminants in the Respiratory Tract - Interpretations from Molecular to Meta Analysis* (Heinrich U, ed). INIS Monographs. Stuttgart, Germany:Fraunhofer IRB Verlag, 181–194
- Poornima Budime Santhosh a, N. P. (2013). Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics. *Cancer Letters*, 8-1
- Pugazhenthiran, N., Murugesan, S., & Anandan, S. (2013). High surface area Ag-TiO₂ nanotubes for solar/visible-light photocatalytic degradation of ceftiofur sodium. *Journal of Hazardous Materials*, 263 Pt 2, 541–9.

- Rahman I., Regulation of nuclear factor- κ B, activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor- α and dexamethasone in alveolar epithelial cells, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1041–1049
- Ralph, S.J., Rodríguez-Enríquez, S., Neuzil, J., Saavedra, E., Moreno-Sánchez, R., 2010. The causes of cancer revisited: “mitochondrial malignancy” and ROS-induced oncogenic transformation why mitochondria are targets for cancer therapy. *Mol. Aspects Med.* 31 (2), 145–170
- Rejman, V. Oberle, I.S. Zuhorn, D. Hoekstra, Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis, *Biochem. J.* 377 (2004) 159–166
- Ritesh K. Shukla, V. S. (2011). ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in Vitro* 25 , 231–241.
- Robichaud CO, Uyar AE, Darby MR, Zucker LG, Wiesner MR. 2009. Estimates of upper bounds and trends in Nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment. *Environ SciTechnol* 43(12):4227–4223
- Sanders, K., Degn, L. L., Mundy, W. R., Zucker, R. M., Dreher, K., Zhao, B., Boyes, W. K. (2012). *In vitro* phototoxicity and hazard identification of nano-scale titanium dioxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(2), 226–36.
- Saqib, Q., Al-khedhairi, A. A., Siddiqui, M. A., Abou-tarboush, F. M., Azam, A., & Musarrat, J. (2012). Toxicology *in Vitro* Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity , oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicology in Vitro*, 26(2), 351–361.
- Sayes, C., Ivanov, I. «Comparative study of predictive computational models for nanoparticle-induced cytotoxicity.» *Risk Anal*, 2010: 1723–1734.
- Sayes, C.M., Reed, K.L., Glover, K.P., Swain, K.A., Ostraat, M.L., Donner, E.M., Warheit, D.B., 2010. Changing the dose metric for inhalation toxicity studies: short-term study in rats with engineered aerosolized amorphous silica nanoparticles. *Inhal. Toxicol.* 22, 348–354
- Schlebusch H, Rick W, Lang H, Knedel M: *Dtsch. Med. Wschr.* 99: 765, 1974.
- Schulte, P. a., C. L. Geraci, V. Murashov, E. D. Kuempel, R. D. Zumwalde, V. Castranova, M. D. Hoover, L. Hodson, and K. F. Martinez. 2013. “Occupational Safety and Health Criteria for Responsible Development of Nanotechnology.” *Journal of Nanoparticle Research* 16 (1) 2153.

- Shi J., Y. H. (2012). Hemolytic properties of synthetic nano- and porous silica particles: The effect of surface properties and the protection by the plasma corona. *Acta Biomaterialia*, 3478–3490.
- Shi, Y., Wang, F., He, J., Yadav, S., Wang, H., 2010. Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in BEAS-2B cells through the caspase 8/t-Bid-independent mitochondrial pathway. *Toxicol. Lett.* 196, 21–27
- Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG & Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999; 163(11): 6236–6243
- Shinohara, N., Danno, N., Ichinose, T., Sasaki, T., Fukui, H., Honda, K., & Gamo, M. (2014). Tissue distribution and clearance of intravenously administered titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(2), 132–41.
- Shi-Qiang Li, Rong-Rong Zhu, Hong Zhu, Meng Xue, et. al. 2008 “Nanotoxicity of TiO₂ nanoparticles to erythrocyte *in Vitro*”. China
- Shukla, R.K., Sharma, V., Pandey, A.K., Singh, S., Sultana, S., Dhawan, A., 2011. ROS- 552 mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol. In Vitro.* 25 (1), 231–341.
- Sierra-Puente, R. E., Campos-Rodríguez, R., Jarillo-Luna, R. a, Muñoz-Fernández, L., Rodríguez, M. G., Muñoz-Ortega, M. H., & Ventura-Juárez, J. (2009). Expression of immune modulator cytokines in human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunology*, 31(7), 384–91.
- Singh, N., Jenkins, G. J. S., Asadi, R., & Doak, S. H. (2010). Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews*, 1, 1–15.
- Slater JH, Frey W. Nanopatterning of fibronectin and the influence of integrin clustering on endothelial cell spreading and proliferation. *J Biomed Mater Res A* 2008;87A:176–85
- Stocker, R. N. (1986). Protection of vitamin E from oxidation by increased ascorbic acid content within Plasmodium vinckei-infected erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 876, 294-299.
- Sumit Arora, Jyutika M. Rajwade, Kishore M. Paknikar “nanotoxicology and in vivo studies: The need of the hour” *Toxicology and Applied Pharmacology* 258 (2012) 151-165.

- Sun, A., Zhang, G., & Xu, Y. (2005). Photobleaching of metal phthalocyanine sulfonates under UV and visible light irradiation over TiO₂ semiconductor. *Materials Letters*, 59(29-30), 4016–4019.
- Sushma Jadalannagari, Ketaki Deshmukh, Sutapa Roy Ramanan, Meenal Kowshik. «Antimicrobial activity of hemocompatible silver doped hydroxyapatite nanoparticles synthesized by modified sol–gel technique.» *Springer*, 2013.
- Tiriveedhi, V., Kitchens, K. M., Nevels, K. J., Ghandehari, H., & Butko, P. (2011). Kinetic analysis of the interaction between poly(amidoamine) dendrimers and model lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(1), 209–18.
- Tiriveedhi, V., Kitchens, K. M., Nevels, K. J., Ghandehari, H., & Butko, P. (2011). Kinetic analysis of the interaction between poly(amidoamine) dendrimers and model lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(1), 209–18.
- Traversa, E., Luisa, M., Vona, D. I., Nunziante, P., Licoccia, S., Dipartimento, I. Ricerca, V. (2001). Photoelectrochemical Properties of Sol-Gel Processed Ag-TiO₂ Nanocomposite Thin Films, 115–123.
- Trop, M., Novak, M., Rodl, S., Hellbom, B., Kroell, W., Goessler, W., 2006. Silver-coated dressing Acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J. Trauma* 60, 648–652.
- Unfried K, C. Albrecht, L.-O. Klotz, A. Von Mikecz, S. Grether-Beck, R.P.F. Schins, Cellular response to nanoparticles: target structures and mechanisms, *Nanotoxicology* 1 (2007) 52–71.
- Wang, J., Zhou, G., Chen, C., Yu, H., Wang, T., Ma, Y Chai, Z. (2007). Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology Letters*, 168(2), 176–85.
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W.W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G.M., Budinger, G.R., Chandel, N.S., 2010. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 8788–8793
- Wen Fana, W. Y. (2012). Erythrocytes load of low molecular weight chitosan nanoparticles as a potential vascular drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 258– 265.
- William K. Boyes, R. Chen, C. Chen. R. Yokel. (2012) The neurotoxic potential of engineered nano-material. *NeuroToxicology*. Neurotox.1328

- Winterbourn, C. C. (1987). Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. *J Clin Invest*, 1486-1491
- Wrighting, D.M., Andrews, N.C. (2006). Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*. 108:3204-3209.
- Wolfgang Hadnagy, B. M. (2003). Hemolytic activity of cristalline silica- Separated erythrocytes versus whole blood. *International Journal of Hygiene and Enviromental health*, 103-107.
- Worldwide, International Standars. «ASTM F756 - 08 Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials.» s.f.
- Xianglu Hana, N. C.-M. (2012). Assessing the relevance of *in vitro* studies in nanotoxicology by examining. *Toxicology*, 1-9.
- Xu, J., Shi, H., Ruth, M., Yu, H., Lazar, L., Zou, B., Zhao, J. (2013). Acute toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in mice. *PloS One*, 8(8)
- Xubin Pan, I. M.-R. (2010). Nanocharacterization and bactericidal performance of silver modified titania photocatalyst. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 77, 82–89.
- Xue, C., Wu, J., Lan, F., Liu, W., Yang, X., Zeng, F., Xu, H., 2010. Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10, 8500–8507
- Yanmei Duan, J. L. (2010). Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice. *Biomaterials* 31, 894–899
- Yannan Zhao, X. S. (2011). Interaction of Mesoporous Silica Nanoparticles with Human Red Blood Cell Membranes: Size and Surface Effects. *American Chemical Society*, 1366-1375.
- Yap FL, Zhang Y. Protein and cell micropatterning and its integration with micro/nanoparticles assembly. *Biosens Bioelectron* 2007;22:775–88
- Yawata, Y. Cell Membrane: the Red Blood Cell as a Model; Wiley- VCH: Weinheim, Germany, 2003; pp 38-40
- Ying Zhoua, Y. Z. (2012). Radiation synthesis and characterization of nanosilver/gelatin/carboxymethyl chitosan hydrogel. *Radiation Physics and Chemistry journal* 81, 553-560

- Yu, H., Irie, H., Shimodaira, Y., Hosogi, Y., Kuroda, Y., Miyauchi, M., & Hashimoto, K. (2010). An Efficient Visible-Light-Sensitive Fe (III) -Grafted TiO₂ Photocatalyst, (lii), 16481–16487.
- Yu, T. Malugin, A., & Ghandehari, H. (2011). Impact of Silica Nanoparticle Design on Cellular Toxicity and Hemolytic Activity, (7), 5717–5728.
- Za-Da Meng, K. Z.-C. (2009). Preparation and Characterization and Visible Light Photocatalytic Activity of Fe-Treated AC/TiO₂ Composites for Methylene Blue. *Journal of the Korean Ceramic Society Vol. 46, No. 6,* 621-626.
- Zan, L., Fa, W., Peng, T., & Gong, Z.-K. (2007). Photocatalysis effect of nanometer TiO₂ and TiO₂-coated ceramic plate on Hepatitis B virus. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology, 86(2),* 165–9.
- Zanella Rodolfo. 2012. Metodologías para la síntesis de nano-partículas: controlando forma y tamaño. Vol. 5. No 1, enero-junio, 2012. Artículos Mundo Nano. www.mundonano.unam.mx
- Ze, Y., Zheng, L., Zhao, X., Gui, S., Sang, X., Su, J., Hong, F. (2013). Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice. *Chemosphere, 92(9),* 1183–9.
- Zhang, R., Bai, Y., Zhang, B., Chen, L., & Yan, B. (2012). The potential health risk of titania nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials, 211-212,* 404–413
- Zhao J, C. V. (2011). Toxicology of nanomaterials used in nanomedicine. *Toxicol Environ Health BCrit Rev, 593–632*
- Zhao, Y., Sun, X., Zhang, G., Trewyn, B. G., Slowing, I. I., & Lin, V. S.-Y. 2011. Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects. *ACS Nano, 5(2),* 1366-1375



1. PRUEBA DE HEMOLISIS

Para la determinación de hemólisis a 37°C se analizaron los eritrocitos lavados (RBC) en condiciones más vulnerables (luz, RBC, 37° C) para determinar la hora en los que éstos presentan hemólisis, ya que al realizar los experimentos a 24 horas el control negativo presentaba hemólisis tanto en luz como oscuridad en RBC a 37° C. Para esta determinación se colocaron 24 controles negativos de 4 pacientes diferentes. En la Imagen 4 se puede observar la variabilidad en el tiempo de hemólisis en las diferentes muestras. La muestra 1 (Imagen 4-A) comenzó a hemolizarse a las 14 horas; la muestra 2 (Imagen 4-B) a las 17 horas, Muestra 3 (Imagen 4-C) a las 16 y horas y la muestra 4-D a las 17 horas; teniendo un rango entre 14 y 18 horas, por lo que se determinó realizar la prueba de hemólisis de los diferentes materiales a 37°C a 12 horas.

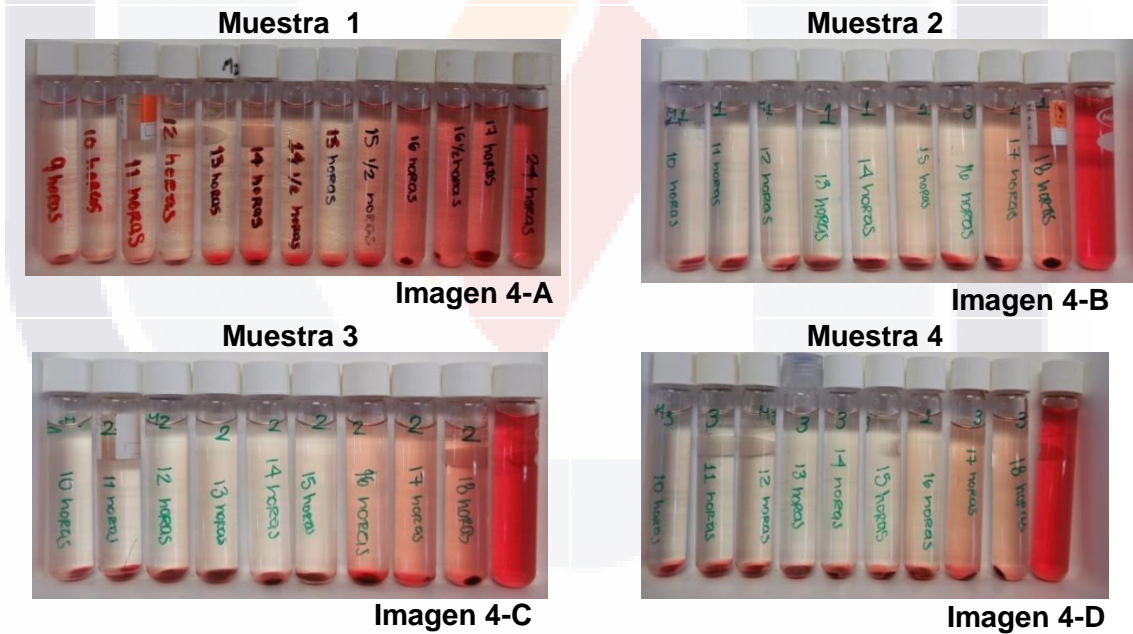


Figura 43: Determinación de hemólisis del control a negativo a 37°C de 4 pacientes diferentes

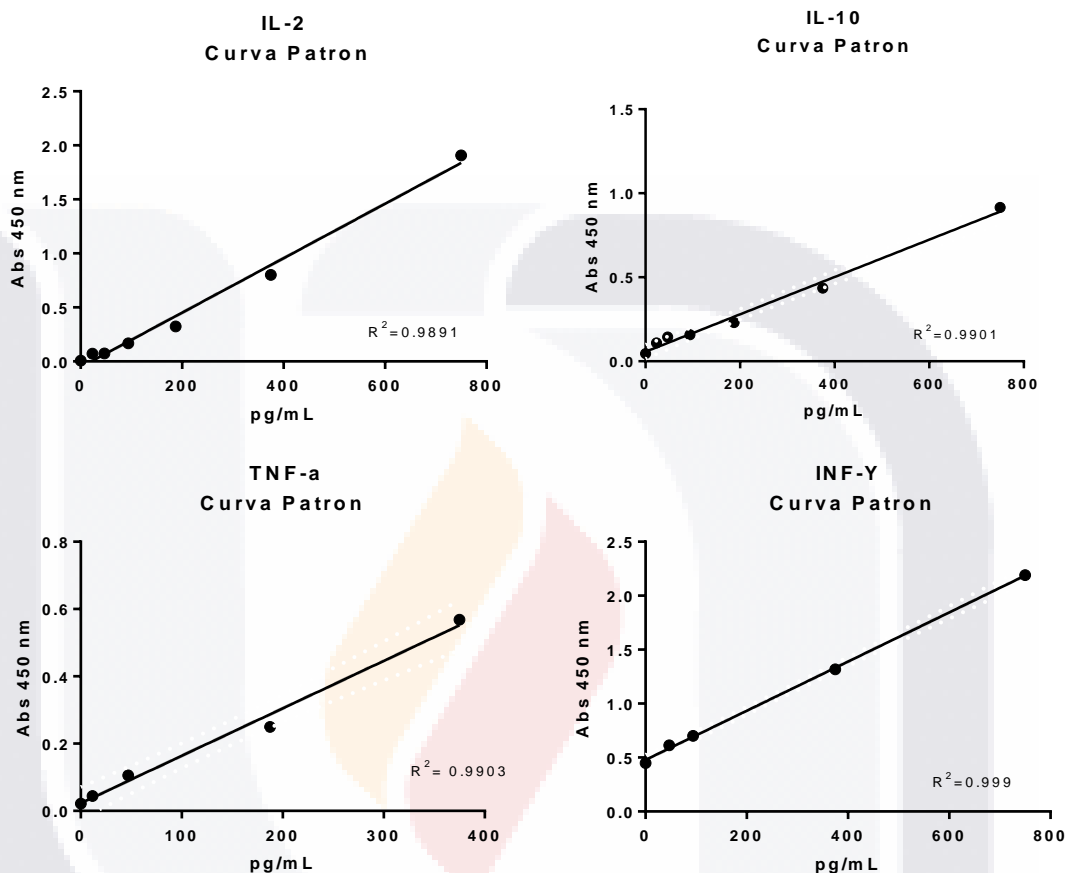
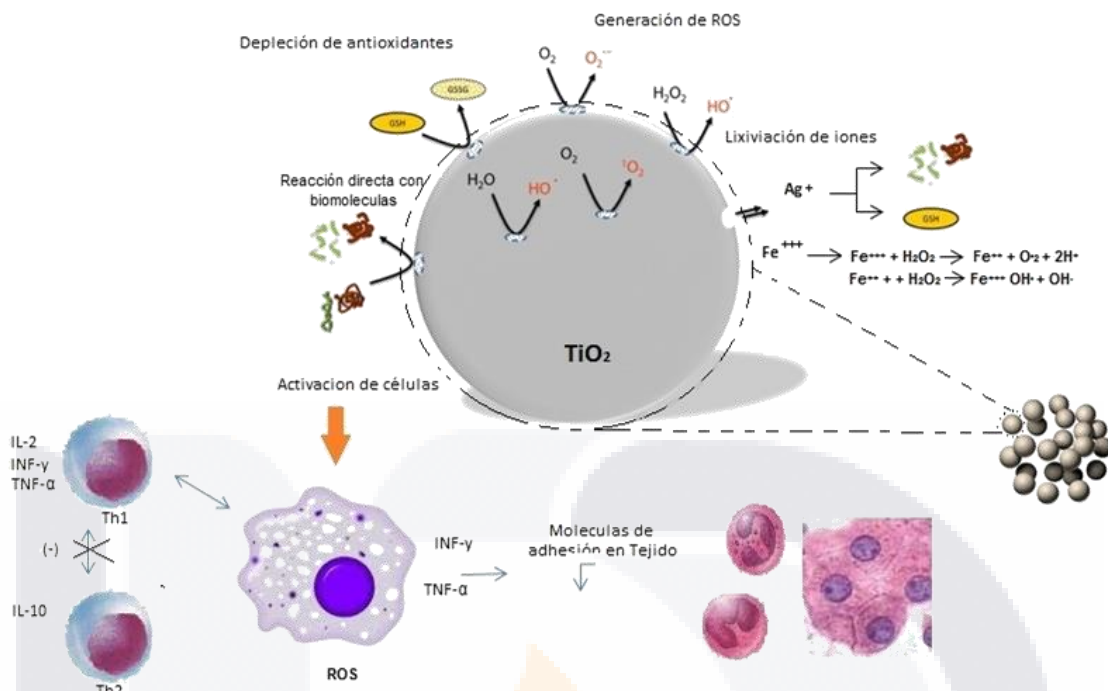


Figura 44: Curva patrón de IL-2, IL-10, TNF-α e INF-γ



Posibles mecanismos de acción de las NPs de TiO_2 , TiO_2 -M