



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA/QUÍMICA**

**TESIS:**

**“ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE  $TiO_2$  Y  $TiO_2/Ag$  EN  
RATAS Wistar Machos”**

**PRESENTA:**

**Carlos Enrique Escárcega González**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS (ÁREA TOXICOLOGÍA)**

**COMITÉ TUTORAL:**

**Dr. Fernando Jaramillo Juárez**

**Dra. Iliana E. Medina Ramírez**

**Dra. Haydée Martínez Ruvalcaba**

**Aguascalientes, Ags., agosto del 2012**

### AUTORIZACIONES



UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE AGUASCALIENTES

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

Estimado Señor Decano:

Nos permitimos comunicarle que después haber analizado la versión escrita del trabajo de tesis "*Estudio de la toxicidad de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub>/Ag en ratas Wistar machos*", realizado por el IBQ Carlos Enrique Escárcega González, estudiante de la Novena Generación del programa de Maestría en Ciencias-Área Toxicología, consideramos que el trabajo:

- 1) Reúne los requisitos de una tesis de Maestría en Ciencias.
- 2) Genera información en el área de la Toxicología.

Por ello, y dado que este trabajo cumple con el requisito establecido en el Artículo 162-Inciso III del Reglamento General de Docencia de la UAA, damos nuestro voto aprobatorio para que la persona antes citada continúe con los trámites administrativos que le permitan presentar su examen de grado.

Aprovechamos este conducto para saludarlo cordialmente.

ATENTAMENTE  
Aguascalientes, Ags., a 12 de octubre de 2012.  
"SE LUMEN PROFERRE"

COMITÉ TUTORAL

  
DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ

  
DRA. ILIANA E. MEDINA RAMÍREZ

  
DRA. HAYDEE MARTÍNEZ RUVALCABA

c.c.p.- Interesado.  
c.c.p.- Archivo.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
Centro de Ciencias Básicas

**IBQ. CARLOS ENRIQUE ESCÁRCEGA GONZÁLEZ**  
**ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN**  
**CIENCIAS EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA**  
**P R E S E N T E .**

Estimado (a) alumno (a) Escárcega:

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: **"Estudio de la toxicidad de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  en ratas *Wistar machos*"**, 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.

A T E N T A M E N T E  
Aguascalientes, Ags., 12 de octubre de 2012  
"SE LUMEN PROFERRE"  
EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLIGOS



c.c.p.- Archivo  
JJRG,mjda

## AGRADECIMIENTOS

Para comenzar, la finalización del proyecto de maestría en Ciencias en el Área de Toxicología que he realizado durante estos últimos dos años, quiero agradecerlo a Dios nuestro Señor, a la Santísima Virgen María, santos y ángeles, por haberme permitido el tener la vitalidad necesaria para poder cumplir con la meta de obtener el grado de maestría que mencione anteriormente.

Ahora bien, en mención a las personas físicas que han sido parte importante en este proyecto quiero agradecer principalmente al Dr. Fernando Jaramillo Juárez quien me ha apoyado día con día y ha estado al pendiente de todas mis dudas y necesidades durante estos últimos 2 años de curso en la Maestría, así como a la Lic.C.N. María Luisa Rodríguez Vázquez quien me estuvo apoyando de manera incondicional durante toda la parte experimental. También quiero agradecer a la Dra. Iliana E. Medina Ramírez y la Dra. Haydée Martínez Ruvalcaba quienes siempre estuvieron al pendiente de mi proyecto de investigación y han atendido mis inquietudes con gusto y en todo momento.

También quiero profundamente agradecer a mi familia, es decir, a mi padre el M.S.O. Carlos Enrique Escárcega Rangel y mi madre Ma. Guadalupe González Jiménez que siempre han estado a mi lado apoyándome en todo momento para seguir en el camino del bien y la superación personal en todos los aspectos. Por supuesto también agradezco a mis hermanos Carolina, Ana Lorena y Ricardo Escárcega González por estar siempre de mi lado y brindarme su apoyo incondicional, y también a mi novia, la Srita. Marisol Romo Romo quien la conocí durante mi estancia en la maestría y ha estado a mi lado apoyándome en toda situación hasta ahora y en todo momento.

Por último, quiero hacer mención de mis agradecimientos a la U.A.A, sus demás profesores y administrativos quienes siempre me ha brindado lo necesario para mi preparación, por supuesto al CONACYT por haberme apoyando con la beca que sin ella no hubiera podido ser posible este proyecto, a mis compañeros de la maestría, y amigos especialmente los de la Estudiantina de la U.A.A. quienes me han acompañado en mi vida durante estos dos últimos años.

“GRACIAS A TODOS”

## INDICE GENERAL

I. Introducción	9
II. Antecedentes	13
II.1. Estrés oxidativo celular	13
II.1.1. Tipos de radicales libres	13
II.1.2. Fuentes de radicales libres	15
II.1.3. Daño oxidativo en ADN, lípidos y proteínas	17
II.1.4. Mecanismos antioxidantes	17
II.1.5. Enfermedades asociadas con el estrés oxidativo	21
II.2. Estrés oxidativo hepático	26
II.2.1. Estrés oxidativo durante la inflamación hepática	26
II.2.2. Estrés oxidativo producido por CIP2E1	27
II.3. Estrés oxidativo Renal	27
II.4. Las nanopartículas de Dióxido de Titanio (TiO <sub>2</sub> )	27
II.4.1. Las nanopartículas Como tratamiento para el cáncer	29
II.4.2. Toxicidad de nanopartículas de TiO <sub>2</sub>	30
II.4.3. Nanopartículas de TiO <sub>2</sub> y la producción de estrés oxidativo	30
III. Justificación	33
IV. Hipótesis de trabajo	35
V. Objetivos	36
V.1. General	36
V.2. Particulares	36
VI. Materiales y Métodos	37
VI.1. Diseño Experimental	37
VI.2. Parámetros evaluados	38
VI.3. Fundamento de los métodos	39

VII. Resultados	43
VII.1. Peso de las ratas	43
VII.2. Concentración de albúmina en sangre (gr/dL)	46
VII.3. Concentración de creatinina en sangre (mg/dL)	49
VII.4. Concentración de malondialdehído en sangre (nm/ml)	52
VII.5. Concentración de transaminasa alanino aminotransferasa (ALT)	55
VII.6. Concentración de transaminasa asparato aminotransferasa (AST)	57
VII.7. Flujo urinario (ml/hr)	59
VII.8. Masa excretada de glucosa en orina (mg/hr)	61
VII.9. Masa excretada de proteínas en orina (mg/hr)	63
VII.10. Masa excretada de sodio (Na) en orina (meq/hr)	65
VII.11. Concentración de glutatión (GSH) en hígado ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de tejido)	67
VII.12. Concentración de glutatión (GSH) en riñón ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de tejido)	69
VII.13. Concentración de malondialdehído (MDA) en hígado (nm/100mg de tejido)	71
VII.14. Concentración de malondialdehído (MDA) en riñón (nm/100mg de tejido)	73
VII.15. Concentración de trifosfato de adenosina (ATP) en hígado (nm/100mg de tejido)	75
VII.16. Concentración de trifosfato de adenosina (ATP) en riñón (nm/100mg de tejido)	77
VII.17. Estudio histológico de hígado	79
VII.18. Estudio histológico de riñón	81
VIII. Discusión de Resultados	83
VIII.1. Daño hepático	83
VIII.2. Daño renal	86
IX. Conclusiones	91
X. Glosario	92
XI. Bibliografía	105

## INDICE DE TABLAS

### VI. Materiales y Métodos

Tabla VI.1. Descripción del diseño experimental utilizado 37

Tabla VI.2. Descripción de los parámetros evaluados durante  
la experimentación 38

### VII. Resultados

Tabla VII.1. Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/kg, i.v.) sobre el peso corporal de ratas Wistar machos a los 1, 14 y 28 días de tratamiento 43

Tabla VII.2. Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de albúmina en sangre de ratas Wistar machos a los 1, 14 y 28 días de tratamiento 46

Tabla VII.3. Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de creatinina en sangre de ratas Wistar machos a los 1, 14 y 28 días de tratamiento 49

Tabla VII.4. Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de MDA en sangre de ratas Wistar machos a los 1, 14 y 28 días de tratamiento. 52

Tabla VII.5. Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración sanguínea de ALT en ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento 55

Tabla VII.6. Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración sanguínea de AST en ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. 57

Tabla VII.7. Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre el flujo urinario de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. 59

Tabla VII.8. Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la cantidad de masa excretada de glucosa en orina en ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. 61

Tabla VII.9. Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la cantidad de masa excretada de proteínas en orina en ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. 63

Tabla VII.10. Efecto de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la cantidad de masa excretada de Na en orina en ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento	65
Tabla VII.11. Efecto de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de GSH en hígado de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento	67
Tabla VII.12. Efecto de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de GSH en riñón de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento	69
Tabla VII.13. Efecto de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de MDA en hígado de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento	71
Tabla VII.14. Efecto de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de MDA en riñón de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento	73
Tabla VII.15. Efecto de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de ATP en hígado de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento	75
Tabla VII.16. Efecto de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de ATP en riñón de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento	77
Tabla VII.17. Efecto de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la arquitectura tisular de hígado de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento	79
Tabla VII.18. Efecto de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la arquitectura tisular de riñón de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento	81

## INDICE DE FIGURAS

### II. Antecedentes

Fig. II.1. Fuentes celulares de ERO y RL	16
Fig. II.2. Mecanismos de defensa antioxidante	19
Fig. II.3. Vías de producción de ERO y mecanismos antioxidantes	20
Fig. II.4. Producción de ERO por las células de Kupffer	26

### VII. Resultados

Fig. VII.1.1. Peso corporal de ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a las 24h) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a las 24h)	44
Fig. VII.1.2. Peso corporal de ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 14 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 14 días)	44
Fig. VII.1.3. Peso corporal de ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	45
Fig VII.2.1. Concentración de albúmina en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a las 24h) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a las 24h)	47
Fig. VII.2.2. Concentración de albúmina en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 14 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 24 días)	47
Fig. VII.2.3. Concentración de albúmina en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	48
Fig. VII.3.1. Concentración de creatinina en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a las 24h) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a las 24h)	50
Fig. VII.3.2. Concentración de creatinina en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 14 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 14 días)	50
Fig. VII.3.3. Concentración de creatinina en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	51

Fig. VII.4.1. Concentración de malondialdehído en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a las 24h) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a las 24h)	53
Fig. VII.4.2. Concentración de malondialdehído en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 14 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 14 días)	53
Fig. VII.4.3. Concentración de malondialdehído en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	54
Fig. VII.5.1. Concentración de ALT en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	56
Fig. VII.6.1. Concentración de AST en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	58
Fig. VII.7.1. Flujo urinario de ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	60
Fig VII.8.1. Masa excretada de glucosa en orina de ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	62
Fig. VII.9.1. Masa excretada de proteínas en orina de ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	64
Fig VII.10.1. Masa excretada de sodio (Na) en orina de ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	66
Fig. VII.11.1. Concentración de GSH en hígado de ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	68
Fig. VII.12.1. Concentración de GSH en riñón de ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	70
Fig. VII.13.1. Concentración de MDA en hígado de ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	72
Fig. VII.14.1. Concentración de MDA en riñón de ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	74
Fig. VII.15.1. Concentración de ATP en hígado de ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	76
Fig. VII.16.1. Concentración de ATP en riñón de ratas Wistar machos tratadas con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO <sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días)	78

## RESUMEN

Existen enfermedades como el cáncer, en la cual se investigan diversos tratamientos adecuados. En este sentido, la nanotecnología es utilizada para fabricar nanomateriales, que sirven como vectores de fármacos para el tratamiento para el cáncer como las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ . Estas nanopartículas se acumulan principalmente en el hígado, bazo, pulmón y riñón, encontrándose la mayor retención en el hígado. Por esta razón es importante el evaluar la toxicidad que estas nanopartículas generan mediante la producción de estrés oxidativo y procesos inflamatorios en células hepáticas y renales expuestas a dicho compuesto.

En este estudio, se obtuvieron muestras de sangre del grupo control y los tratamientos al 1° y 14° día cuantificando albúmina, creatinina, y MDA. A los 28 días se sacrificaron los animales y se obtuvieron muestras de sangre cuantificando los parámetros mencionados más las enzimas ALT y AST, muestras de orina cuantificando el volumen, glucosa, proteínas y Na, y muestras de tejido hepático y renal cuantificando GSH, MDA, ATP, así como el estudio histológico.

Comparando el grupo control con los tratamientos empleados, en las muestras de sangre se obtuvo un incremento de MDA. En el caso de la orina se observó mayor masa excretada de proteínas y Na. Además en los tejidos, se observó una disminución de GSH siendo más significativa en riñón que en hígado, y aumento de MDA en riñón. Por último el estudio histológico muestra daños como pérdida de la arquitectura tisular, células necróticas, vacuolización en el interior de las células tanto hígado como en riñón.

Por lo tanto, las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y de  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ , ejercen toxicidad por medio de la producción de estrés oxidativo en procesos inflamatorios en tejido hepático y renal.

**ABSTRACT**

There are diseases like cancer, where many treatments are investigated. The nanotechnology is used to develop nanomaterials that serve as vectors to the drugs applied to the cancer treatment, as the TiO<sub>2</sub> Nanoparticle. These nanoparticles are mainly gathered on the liver, kidney, lungs and spleen, finding higher concentrations on liver. For this reason it is important to evaluate the toxicity that these nanoparticles generated by the production of oxidative stress and inflammatory processes in liver and kidney cells exposed to said compound.

Blood sample was obtained from control group and the treatments from 1<sup>st</sup> -14<sup>th</sup> day, quantifying creatinin, albumin, MDA. 28 days after, the rats were sacrificed, and a new blood sample was taken quantifying the mentioned parameters plus ALT and AST, urine samples evaluating volume, glucose, protein, Na, hepatic and renal samples apprising GSH, MDA, ATP, as histological research.

Contrasting control group with the treatments used, on the blood samples were obtained a MDA increase. Urine samples had a elevated level for protein and Na excreted. Also in the tissues were seen GSH decrease being more significant on kidney than liver and MDA increase on kidney. For last, the histological research showed damage with loss for tissue architectonics, necrotic cells, insider vacuolization on hepatic and renal cells

Therefore, TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>/Ag nanoparticles perform toxicity by oxidative stress production on inflammatory process belonging to hepatic and renal tissues.

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, existen algunas enfermedades que son problema mundial, ya que se encuentran en prácticamente todo el planeta y afectan a un gran número de personas y son causa de un alto índice de mortalidad en nuestros días. Dentro de estas enfermedades se encuentra el Cáncer, y debido a los efectos que produce este padecimiento, se han estado realizando grandes investigaciones sobre la obtención de tratamientos y medios curativos para personas con esta enfermedad. Por lo que hoy en día se cuenta con una alta tecnología en prácticamente en cualquier campo de aplicación, como lo es el caso de la nanotecnología.

La nanotecnología es una rama de la ciencia de aparición reciente que estudia distintos materiales a escala nanométrica (un nanómetro es una unidad de medida equivalente a  $1 \times 10^{-9} \text{m}$ ). Es decir, participa en el diseño, producción y uso de estructuras químicas con dimensiones extremadamente pequeñas. Los conocimientos actuales sobre la nanotecnología provienen de avances en los campos de la química, física, ciencias de la vida, medicina e ingeniería (<http://www.axxon.com.ar/rev/110/c>).

Existen diversas áreas en las que la nanotecnología está en proceso de desarrollo o en fase de aplicación práctica: 1) en biología y medicina, los nanomateriales se emplean en la mejora del diseño de fármacos y en el desarrollo de nuevos instrumentos y equipos analíticos; 2) en el estudio de los materiales, las nanopartículas permiten la fabricación de productos con propiedades mecánicas nuevas, de mayor resistencia al desgaste y de mejoras en la superficie de rozamiento y de adherencia; 3) en el campo de la ingeniería en electrónica, las nanotecnologías tienen diversas aplicaciones, entre ellas, el diseño y construcción de dispositivos de almacenamiento de datos de menor tamaño, más rápidos y con menor consumo de energía; 4) algunos productos de consumo como los cosméticos, protectores solares, fibras, textiles y pinturas ya incorporan nanopartículas; 5) finalmente, instrumentos ópticos como los microscopios también se han beneficiado de los avances de la nanotecnología (<http://www.campus-oei.org/revistactsi/numero6/articulo04.htm#3a>).

Con relación a la medicina, la nanotecnología ofrece aplicaciones en diversos campos. La base de estas aplicaciones radica en utilizar nanopartículas que funcionan como vectores para introducir en el organismo fármacos, agentes de contraste u otras sustancias. Esto permite dirigir de manera efectiva y específica al fármaco administrado a un órgano o tejido específico del paciente. En apariencia esto no es nuevo ya que, desde hace años, muchos fármacos puede ser transportados en vectores para alcanzar una determinada parte del organismo, en la que ejercen su acción. Sin embargo, la nanotecnología ofrece herramientas para trabajar, como ya se señaló, a una escala extremadamente pequeña. Esto ha permitido que diversas sustancias crucen el endotelio vascular, difundan en el organismo y se introduzcan en las células, alcanzando sus organelos con facilidad. En este contexto, además de los avances que se pueden alcanzar en el diagnóstico de enfermedades (*in vivo* o *in vitro*) es posible que la rama de la nanotecnología con más futuro sea la terapéutica (enfermedades infecciosas y neurodegenerativas, neoplasias, diabetes mellitus, etc.). Este tipo de tratamientos promete ser una excelente opción para aquellas personas que padecen estas enfermedades, sin embargo, estudios toxicológicos sobre la administración de estos tratamientos son necesarios para proteger lo más posible la salud de estas personas. En efecto, los nanofármacos paulatinamente se están abriendo paso en el mercado y, generalmente, su uso supera los beneficios de tratamientos convencionales debido a su mayor efectividad, especificidad y menor incidencia de efectos secundarios (González et al, 2009).

Ejemplo de lo antes descrito es el Paclitaxel, fármaco quimioterápico del grupo de los taxanos o fijadores de tubulina que actúa durante la fase M del ciclo celular, uniéndose a la subunidad  $\beta$  de la tubulina, con lo que evita el crecimiento del tumor ya que estabiliza los microtúbulos e impide su despolimerización. Sin embargo, al igual que la mayoría de los fármacos quimioterápicos, el paclitaxel tiene efectos secundarios indeseables derivados de su mecanismo de acción. En este contexto, se han reportado buenos resultados clínicos en el tratamiento del cáncer de mama multirresistente y de otros tumores (carcinoma de ovario o de pulmón y sarcoma de Kaposi) al usar una formulación nanoparticular de paclitaxel (Abraxane®). Así, al comparar la eficacia terapéutica de esta formulación nanotecnológica contra la formulación convencional del paclitaxel en grupos de pacientes cancerosos, la respuesta siempre fue mejor con el nanofármaco (Hawkins et

al, 2008; Riehemann et al, 2009). Sin embargo, es pertinente señalar que la toxicidad asociada a los nanosistemas es un área poco estudiada a pesar de su gran importancia en el futuro de esta nueva rama de la farmacología moderna.

En el cuerpo humano, el funcionamiento de sus órganos es de vital importancia para mantener el equilibrio saludable de cualquier persona. En este sentido, conviene recordar que el hígado y los riñones participan de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal de los mamíferos. Entre otras funciones, evitan la acumulación tisular de los fármacos por mecanismos que incluyen la alteración enzimática de sus estructuras químicas y su excreción. Por ello, se debe señalar que la unidad básica estructural y funcional de los riñones es la nefrona, la cual está formada por un aparato de filtración o glomérulo conectado a una porción tubular larga que reabsorbe o secreta sustancias endógenas y xenobióticos. Las nefronas realizan su trabajo a través de tres procesos fundamentales: filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción tubular. Estos procesos determinan la presencia de los xenobióticos en la orina, de tal manera que su concentración final en este fluido es el resultado de la suma de la filtración y la secreción menos la reabsorción tubular. Asimismo, el hígado participa de manera importante en la biotransformación de los xenobióticos y en su excreción biliar. Al respecto, en el humano adulto, la bilis es producida por el hígado a una velocidad de 0.5 a 1.0 L/día y es vertida en el duodeno a través del colédoco. En general, los compuestos polares y de peso molecular elevado se eliminan con la bilis. Por lo tanto, el daño hepático o renal favorece la acumulación de los xenobióticos en el organismo (Le Blanc, 1994; Armijo, 2003), y además, estos órganos son blanco fácil de muchas sustancias químicas que pueden producir toxicidad y daños en sus tejidos alterando las funciones vitales que llevan a cabo con el consecuente daño general y producción de enfermedades.

Las nanopartículas de  $TiO_2$ , como su nombre lo indica están formadas por el metal Titanio (Ti), el cual es un metal no fisiológico. Dentro de este tipo de metales se encuentran también otros como el Plomo (Pb), el Cromo (Cr), el Arsénico (Ar), que producen toxicidad en células hepáticas y renales mediante varios mecanismos entre los que destaca la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), que desencadena una serie de eventos que pueden terminar en un estado de Estrés Oxidativo para las células causando daños y muerte de tejido de dichos órganos. Entre sus principales

aplicaciones, las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  se utilizan como pigmento en la producción pinturas y plásticos, así como en papel, tintas de impresión, productos textiles, alimentarios, en la industria cerámica y manufactura de cemento blanco. Además el  $\text{TiO}_2$  es utilizado como absorbente de rayos UV en productos para el bronceado, jabones, polvos cosméticos, cremas, pastas de dientes, papel del cigarro y la industria cosmética. Actualmente se producen nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  que se aplican como vehículo de fármacos para personas enfermas con cáncer. Por lo tanto, al utilizar nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  en aplicaciones terapéuticas, es de esperarse que estas sustancias tengan efectos toxicológicos similares que los producidos por Pb, Cr, y Ar principalmente en tejidos hepáticos y renales.

Por tal razón, es de suma importancia el poder evaluar los efectos toxicológicos producidos por el tratamiento con nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , basados en la producción de estrés oxidativo tanto en hígado como en riñón, con el fin de llegar a una conclusión que permita discernir si estos tratamientos a largo plazo que si bien, pudieran curar algún tipo de cáncer, llegarán en un momento dado causar enfermedades como Insuficiencia Renal (IR) o Fibrosis Hepática (FH), entre otras.

En el presente trabajo, se evalúa la toxicidad basada en la producción de estrés oxidativo en hígado y en riñón producido por nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , que permite observar los resultados y conclusiones necesarias para poder decidir si este tipo de tratamiento contra el cáncer, es adecuado para la preservación de la salud de las personas que padecen dicha enfermedad.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Estrés oxidativo celular.

En bioquímica se considera oxidación a todo proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o una cesión de hidrógeno (deshidrogenación), y reducción a aquel otro en el cual se captan electrones o se pierden oxígenos. Todo proceso de oxidación va siempre acompañado de otro de reducción. Son reacción de óxido-reducción o reacciones redox entre pares conjugados. (Elejalde, 2001)

Generalmente el oxígeno, es el causante la mayoría de los procesos oxidativos celulares, sin embargo, de acuerdo con la primera publicación de Gershman's sobre la teoría de los radicales libres en la toxicidad por el oxígeno elaborada en 1954 (Valko et al., 2006), este oxígeno que es imprescindible para la vida, puede ser también fuente de enfermedad a través de una producción incontrolada de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) que dañan las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, entre otros (Elejalde 2001). Estas especies reactivas de oxígeno o comúnmente llamadas Radicales Libres (RL), son un conjunto de moléculas capaces de interactuar con varios componentes tisulares, con el fin de estabilizar su carga electrónica (Kehrer, 1993).

#### II.1.1 Tipos de radicales libres.

Como ya se mencionó, existen ERO que causan daños en componentes celulares por medio de reacción óxido-reducción, sin embargo, no todos los RL son formados por oxígeno, es decir, existen otros radicales libres formados por otros compuestos o elementos que también tienen efectos nocivos en algunos componentes celulares, basados en reacciones de óxido-reducción. Los tipos de RL que se producen más frecuentemente en los procesos celulares se describen a continuación.

1) Especies Reactivas de Oxígeno (ERO):

Oxígeno molecular ( $O_2$ ). Debido a su configuración electrónica, es por sí mismo un radical (valko et al., 2006).

Radical superóxido ( $\bullet O_2^-$ ). Es producido en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y es considerado la ERO primaria que puede interactuar con otras moléculas para generar otras ERO secundarias. (Valko et al., 2006).

Peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ). Es formado por la enzima superóxido dismutasa (SOD), a partir del  $\bullet O_2^-$ . Además es sabido que es producido por los peroxisomas bajo condiciones fisiológicas durante el consumo de oxígeno. Sin embargo cuando existe daño en los peroxisomas, este radical sale hacia el citosol celular pudiendo dañar estructuras y contribuyendo significativamente en el estrés oxidativo. (Valko et al., 2006).

Radical hidroxil ( $\bullet OH$ ). Es altamente reactivo y muy peligroso con una vida media corta de  $10^{-9}$ s. Es producido por algunos metales de transición fisiológicos ( $Fe^{+2}$ ,  $Cu^+$ ) a partir de  $H_2O_2$  por medio de la reacción de Fenton. (Valko et al., 2006).



Radicales peroxil ( $ROO\bullet$ ,  $RO\bullet$ ). Son formados debido a la actividad oxidativa de otros radicales libres e inician la peroxidación lipídica de membranas celulares.

- 2) Radicales libres producidos a partir de compuestos de Nitrógeno (ERN), como el óxido nítrico ( $NO\bullet$ ) y radical peroxinitrito ( $OONO^-$ ).
- 3) Radicales libres producidos a partir de compuestos de Carbono.
- 4) Radicales libres producidos a partir de compuestos de Azufre.

- 5) Radicales libres producidos por la acción catalizadora de algunos metales ( $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^+$ ).

Sin embargo, las ERO, pueden tener efectos benéficos cuando se presentan en bajas y moderadas concentraciones debido a que participan en la respuesta contra agentes infecciosos y en la función de numerosos sistemas de señalización celular (Valko et al., 2006).

### **II.1.2 Fuentes de Radicales libres**

Existe varias fuentes intracelulares productoras de ERO y RL, que ha sido claramente identificadas., (Kehrer, 1993), las cuales se describen a continuación:

- 1) Fagocitos.

Estas células durante su metabolismo normal, producen RL que sin embargo en determinadas condiciones, la producción de estos compuestos puede ir más allá de las células blanco y dañar otras células y tejidos cercanos a ellos. (Kehrer, 1993).

- 2) Sistema Mitocondrial de Transporte de Electrones.

Durante el metabolismo aerobio, la mitocondria en su sistema de transporte de electrones produce ERO con aproximadamente el 2% del oxígeno consumido y por lo tanto es la mayor fuente de producción de ERO principalmente  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Kehner, 1993). Esta producción de ERO, se puede llevar a cabo en todos los complejos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones.

- 3) Sistema Microsomal de Transporte de Electrones.

Las enzimas oxidadas (monooxigenasas) del sistema membranal del Retículo Endoplásmico Liso (REL), pueden producir ERO que pueden dañar componentes celulares al interactuar con algunos xenobióticos. (Kehner, 1993).

4) Enzimas oxidasas solubles.

Algunas enzimas que se encuentran inmersas en el citoplasma como la Xantina oxidasa, dopamina β-hidrolasa, D-aminoácido oxidasa, urato oxidasa, Acil CoA oxidasa, pueden generar ERO. (Kehrer, 1993).

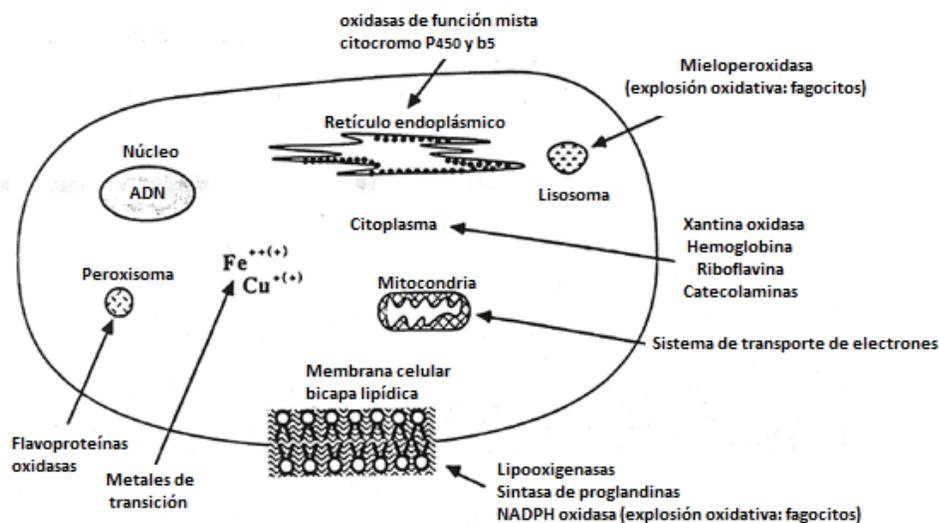
5) Autoxidación de sustratos endógenos y exógenos.

Algunas sustancias endógenas y exógenas como la epinefrina y dopamina generan R.L. en varias situaciones que pueden incluso asociarse con daños y enfermedades como el Mal de Parkinson. (Kehrer, 1993).

6) Metales de Transición

Algunos metales como el Hierro (Fe) y el Cobre (Cu), transfieren e<sup>-</sup> entre biomoléculas, generando ERO. (Kehrer, 1993).

Para una mayor comprensión de este apartado, En la **Figura II.1**, se muestran todas las fuentes de ERO y RL mencionadas anteriormente.



**Fig. II.1.** Fuentes celulares de ERO y RL. (Kehrer, 1993).

### **II.1.3 Daño oxidativo en ADN, lípidos y proteínas.**

Cuando se tienen altas concentraciones de ERO, y se supera la capacidad antioxidante de la célula para contrarrestar los efectos adversos de estas moléculas, éstas atacan a las estructuras celulares produciendo daños en su funcionamiento.

El radical hidroxil, reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN, dañando las bases purinas y pirimidinas con la formación de 8-hidroxiguanina (8-OH-G), el cual está relacionado con mutagénesis y carcinogénesis. Al respecto, es sabido que la generación de ERO mediadas por metales, pueden atacar los ácidos grasos poliinsaturados de los residuos de fosfolípidos, en los cuales el producto final de dicha peroxidación es el malondialdehído (MDA) y el 4 hidroxinonenal (HNE). MDA es mutagénico en células de mamíferos y carcinogénico en ratas. HNE es débilmente mutagénico pero al parecer es el mayor producto tóxico de la peroxidación lipídica. (Valko et al., 2006).

En cuanto a las proteínas, éstas también pueden ser alteradas por las ERO/ERN, principalmente en los residuos de cisteína y metionina (Valko et al., 2006), dañando los grupos tiol y de esta manera modificando la estructura de la proteína y por ende, su función fisiológica.

En el caso de que el grado de estrés oxidativo sea moderado, la apoptosis puede ser estimulada, pero en el caso de que dicho grado sea muy intenso, el proceso de necrosis puede llegar a ser inducido (Valko et al., 2006).

### **II.1.4 Mecanismos antioxidantes.**

En todas las células, existen mecanismos de defensa en contra de la acción de las ERO y RL, para evitar el estrés oxidativo producido por dichas moléculas. Estos mecanismos llamados antioxidantes, están compuesto por moléculas que son capaces de donar los electrones que las ERO y RL necesitan para estabilizarse, de esta forma se

logra evitar o retardar los efectos nocivos producidos por estas moléculas y por consiguiente la protección de los componentes celulares.

Dentro de los mecanismos antioxidantes existen algunos que son sistemas enzimáticos (endógenos), que protegen a las células del estrés oxidativo, y además existen algunos otros que se pueden obtener de la dieta (exógenos), y son no enzimáticos. Dichos mecanismos se describen a continuación:

A) Mecanismos antioxidantes endógenos (Enzimáticos):

- 1) Superóxido Dismutasa (SOD). Cataliza la reacción:  $\bullet\text{O}_2^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ .
- 2) Glutación peroxidasa (GPx). Reducen hidroperóxidos a alcoholes.
- 3) Glutación Transferasa (GST). Reducen hidroperóxidos a alcoholes.
- 4) Catalasa (CAT). Reduce  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ .

B) Mecanismos antioxidantes exógenos (No enzimáticos).

- 1)  $\alpha$ -Tocoferol (Vitamina E).
- 2) Ácido ascórbico (Vitamina C)
- 3)  $\beta$ -caroteno o Provitamina A.
- 4) Captadores de Radicales Libres (Polifenoles).

Al respecto, las células cuentan con un tripéptido llamada glutación (GSH), que es el mayor antioxidante y regulador redox en la células, siendo su forma oxidada el glutación disulfuro GSSG. Este compuesto es abundante en el citosol y en la mitocondria, siendo el cociente GSH/GSSG, un buen indicador sobre el grado de estrés oxidativo de un organismo (Valko et al., 2006).

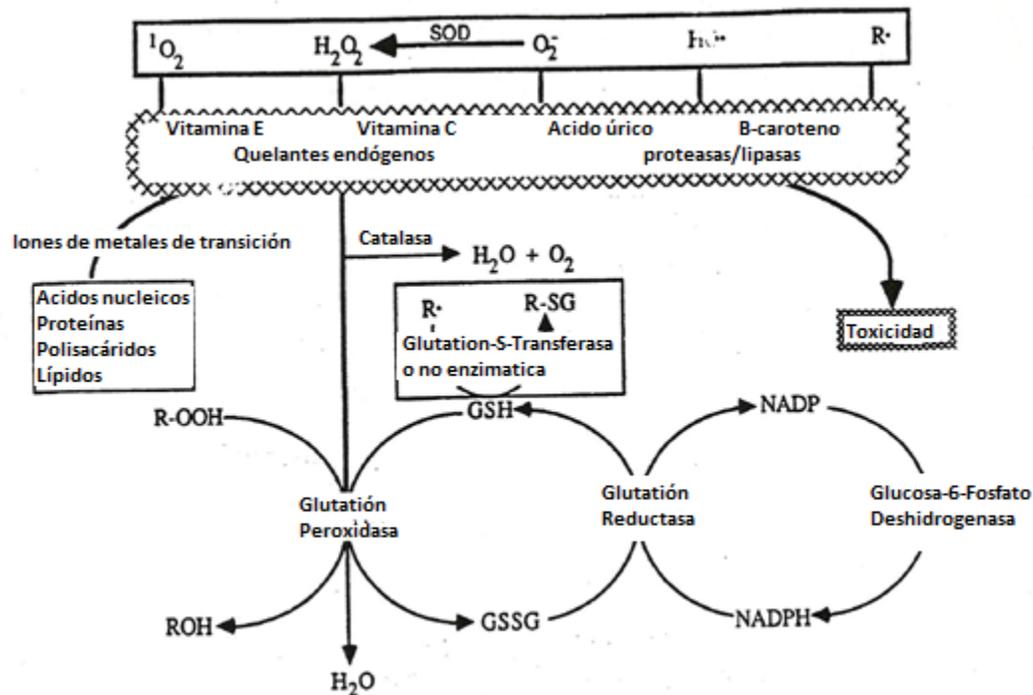
El GSH, dentro de sus funciones e importancia se puede mencionar que mantiene el equilibrio redox de proteínas necesarias para la reparación y expresión del DNA, es cofactor de enzimas que actúan en contra del estrés oxidativo como la GPx y GST, actúa como atrapador de radicales hidroxil y singulete de oxígeno mediante la detoxificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  evita la lipoperoxidación por medio de la enzima GPx, forma parte en la prevención

de apoptosis celular, y además el hecho de que puede regenerar antioxidantes como la Vitamina C y Vitamina E por medio de su reducción y obtener la forma activa de dichos compuestos (Valko et al., 2006).

Además existen otros mecanismos antioxidantes como algunas proteínas transportadoras de metales como las tioredoxinas (TRX), las cuales interceptan estos elementos para evitar su acción catalizadora formadora de ERO, proteasas celulares que son las encargadas de la eliminación de las proteínas alteradas por procesos de oxidación, que son a su vez fuente generadora de más ERO y finalmente los compuestos que se encargan de reparar las biomoléculas dañadas por los ERO. (Elejalde, 2001).

El conocimiento sobre los mecanismos por los cuales el GSH y las TRX mantienen el equilibrio redox celular, puede ser usado como objetivo en la prevención de cáncer y elaboración de agentes terapéuticos (Valko et al., 2006).

En la **Figura II.2 y II.3**, se muestra un esquema con los principales mecanismos de defensa antioxidantes y las vías metabólicas productoras de ERO y RL.



**Fig. II.2.** Mecanismos de defensa antioxidantes. (Kehrer, 1993).

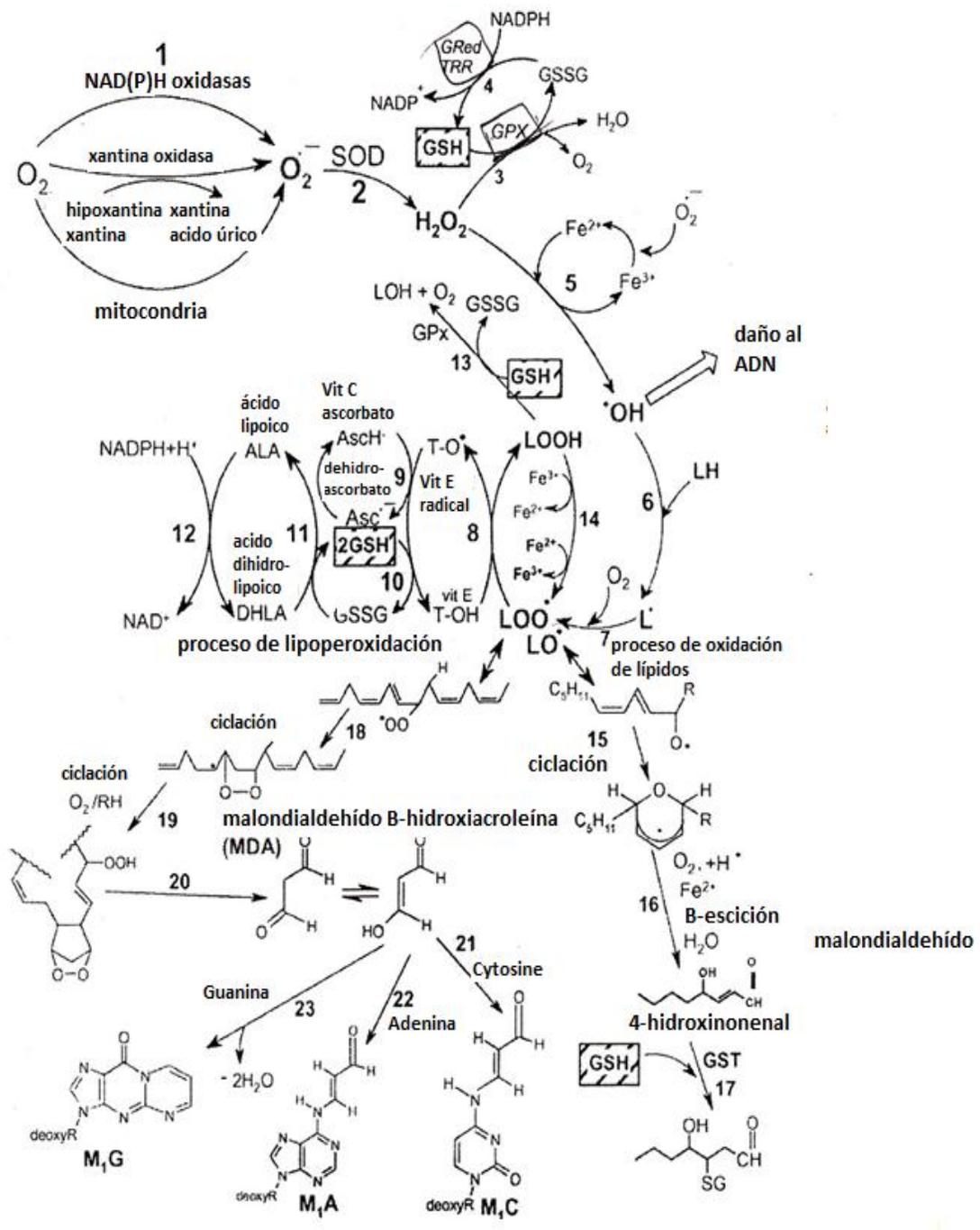


Fig. II.3. Vías de producción de ERO y mecanismos antioxidantes (Valko, et al., 2006).

### II.1.5 Enfermedades asociadas con el estrés oxidativo.

Las ERO y los RL, han sido involucradas en numerosos daños y enfermedades, ya que se ha comprobado juegan un rol importante en el mecanismos de producción de dichos daños. Entre los daños y enfermedades más comúnmente asociadas la producción de estrés oxidativo, se encuentran el proceso inflamatorio, el envejecimiento, artritis reumatoide, aterosclerosis, cáncer, y por supuesto daños oxidativos en riñón (insuficiencia renal aguda o crónica), y en hígado (cirrosis, insuficiencia hepática), (Elejalde, 2001), que son los órganos de estudio en el presente trabajo.

#### 1) Cáncer

El estrés oxidativo induce un desbalance en el estado redox de la célula, y este desequilibrio, se relaciona con la estimulación de oncogenes. Se puede producir daño oxidativo a nivel ADN, lo que representa el primer paso en la aparición del fenómeno de mutagénesis y carcinogénesis. La aparición del compuesto 8-hidroxi-guanina (8-OH-G), es el principal biomarcador de daño en el ADN y por consiguiente en la carcinogénesis. (Valko et al., 2006).

Además, la lipoperoxidación también está implicada en el proceso de carcinogénesis. La aparición de MDA, es mutagénica en células bacteriales y células de mamíferos (Valko et al., 2006), y además el otro producto de la lipoperoxidación, el HNE, es levemente mutagénico pero es el mayor producto tóxico de dicho proceso oxidativo. (Valko et a., 2006). Además, se ha encontrado daño en ADN mitocondrial en proceso de carcinogénesis, pero estos mecanismos no están aún bien establecidos.

Entre algunos agentes que pueden desencadenar proceso carcinogénicos relacionados con la producción de ERO, se encuentran varios metales que pueden llevar a cabo reacciones redox como el hierro que puede producir asbestosis, el cobre, el cadmio, el cromo hexavalente, el arsénico, el humo del tabaco, entre otros.

Sin embargo, las células cuentan con mecanismos antioxidantes que pueden prevenir el proceso de mutagénesis y carcinogénesis, como la enzima Mn-SOD, que

reduce las ERO que pueden dañar el ADN, la enzima GST, que transforma una gran cantidad de sustancias carcinogénicas, compuestos como N-acetyl-cisteína (NAC), polifenoles y Vitamina E, que también pueden ejercer un efecto protector contra este tipo de procesos patológicos.

## 2) Enfermedad cardiovascular

El estrés oxidativo producido por ERO, participa en varias enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, enfermedad isquémica del corazón, hipertensión, cardiomiopatías, hipertrófia cardíaca y fallo congestivo del corazón (Valko et al., 2006). El daño oxidativo producido por la ERO a nivel componentes celulares como las membranas y proteínas, conduce a alteraciones en los organelos celulares de los miocitos, con la consecuente falla de su función, siendo las principales fuentes de estrés oxidativo en sistemas cardiovasculares, la enzimas xantina oxidoreductasa (XOR), NADPH oxidasa, sintasa de óxido nítrico (NOS), citocromos mitocondriales y la hemoglobina. (Valko et al., 2006).

En el caso de la aterosclerosis, existen varias formas sobre las cuales el estrés oxidativo contribuye al daño en dicha enfermedad. Por ejemplo, en experimentos se han revelado cantidades significantes de hierro en lesiones ateroscleróticas, lo que indica que el hierro actúa como catalizador en la formación de radicales libres y forma parte en el proceso de desarrollo de aterosclerosis (Yuan & Li, 2003., Valko et al., 2006). Niveles de  $Ca^{+2}$  intracelulares incrementados, sugieren que induce estrés oxidativo y participa en la aterosclerosis (Valko et al., 2006). La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ha sido reportado que potencia la formación de superóxido que conduce a la apoptosis de células de la pared vascular y la producción de ERO mediada por las  $LDL_{ox}$ , y causa además la formación de la placa aterosclerótica. Estos efectos pueden ser contrarrestados por medio de tratamientos con SOD y catalasa (Valko et al., 2006).

## 3) Daño en isquemia/repercusión

El daño en la isquemia/repercusión, es un problema clínico relevante que ocurre como un daño en el miocardio durante la restauración del flujo sanguíneo después de un

período de oclusión coronaria (Valko, et al 2006). Durante este proceso, se generan grandes cantidad de ERO como el radical superóxido y peróxido de hidrógeno, que son las causantes de los daños en dichas células cardiacas.

Sin embargo se han realizado estudios sobre los mecanismos enzimáticos antioxidantes celulares que pudieran disminuir los daños producidos por este procedimiento clínico. Por ejemplo, una sobreexpresión de MnSOD disminuye significativamente la necrosis del miocardio después del daño por repercusión (Valko, et al 2006).

#### 4) Artritis reumatoide

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que causa inflamación crónica en las articulaciones y tejidos alrededor de las articulaciones con infiltración de macrófagos y células T activadas (Bauerova & Bezek, 1999, Valko et al., 2006). Esta enfermedad está relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno en el sitio de la inflamación, que contribuyen a incrementar el daño y la aparición de los síntomas de dicha enfermedad.

#### 5) Diabetes

El incremento en la concentración de glucosa en sangre (hiperglicemia), está relacionado con la aparición de estrés oxidativo ya que estimula la formación de ERO en el organismo a partir de diversas fuentes. Estas fuentes incluyen la fosforilación oxidativa, autooxidación de la glucosa, NADPH oxidasa, lipooxigenasa, citocromo P450 de monooxigenasas y óxido nítrico sintasa (NOS) (Valko et al., 2006).

Al respecto, entre las fuentes de ERO durante esta enfermedad se encuentra el complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, la enzima NADPH que favorece la producción de estos radicales en células vasculares y renales (Valko, et al., 2006), siendo esta enzima un factor importante en el desarrollo de la diabetes. También se tiene que la autooxidación de la glucosa favorece la producción de ERO, y además, en esta enfermedad la glucosa puede reaccionar con  $H_2O_2$  en presencia de iones cobre y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hierro para formar radical  $\bullet\text{OH}$  (Valko, et al., 2006). Al respecto, otra enzima que participa de manera importante en la formación de ERO, es la enzima Xantina Oxidasa, que se puede inhibir mediante la administración de alopurinol mejorando el flujo sanguíneo disminuyendo el grado de lipoperoxidación lipídica (Valko, et al., 2006).

En este contexto, existen en las células mecanismos antioxidantes protectores en contra de la acción de los radicales libres, como la Vitamina E y la Vitamina C, que actúan en conjunto para la protección de los fosfolípidos de membrana y evitar su lipoperoxidación, sin embargo, la producción de ERO y ERN, pueden disminuir la actividad de estas vitaminas, causando daños celulares, además de una acumulación de MDA (Valko, et al., 2006).

Por otra parte, diabetes mellitus tipo 2, la forma más común de esta enfermedad, se debe a una resistencia a la insulina que presentan las personas que la padecen, debido a daños en las células  $\beta$  del páncreas productoras de insulina, las cuales, debido a su baja capacidad antioxidante, son blanco fácil para las ERO con el consecuente daño, por lo tanto, tratamientos antioxidantes, pueden producir efectos benéficos en diabetes debido a la preservación de las células  $\beta$  productoras de insulina (Valko, et al., 2006).

#### 6) Enfermedad de Alzheimer

En esta enfermedad, la acumulación del péptido  $\beta$ -Amiloide, componente de las placas seniles en el cerebro, se ha asociado con daños producidos por estrés oxidativo. En este contexto, mutaciones en la producción de este péptido, hace que se tenga una agregación mayor en los depósitos amiloides. En este sentido, la forma anormal del péptido, mediante reacciones de óxido-reducción, genera  $\text{Cu}^+$  a partir de  $\text{Cu}^{+2}$ , produciendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  como subproducto. También el  $\text{Cu}^+$  es un fuerte mediador en la producción de radical  $\bullet\text{OH}$ . (Valko, et al., 2006).

Estos eventos relacionados con el estrés oxidativo, modifican el balance entre metales fisiológicos como el zinc, el cobre y el metabolismo del péptido  $\beta$ -amiloide, con consecuencias relacionadas con citotoxicidad mediado por estrés oxidativo.

## 7) Enfermedad de Parkinson

En esta enfermedad, se observa una pérdida de neuronas del tallo cerebral específicamente en la sustancia negra, las cuales utilizan dopamina para comunicarse con células de otras regiones cerebrales. En este contexto, el estrés oxidativo favorece la pérdida de dichas células debido a procesos inflamatorios en los que producen más ERO, seguido de una fuerte depleción del glutatión, (Valko, et al., 2006) produciendo efectos dañinos en este tipo de neuronas y el desarrollo de esta enfermedad.

## 8) Envejecimiento

El proceso de envejecimiento se ha asociado con la producción de estrés oxidativo, en el cual, las ERO dañan estructuras celulares como fosfolípidos, proteínas y DNA, lo cual conlleva a la degeneración celular de los tejidos característica de este fenómeno.

En este sentido, la forma en la cual se tienen daños oxidativos a estructuras celulares, es debido a que el oxígeno que respiramos, entre 1-3% es convertido a radical superóxido en mitocondrias el cual comienza a ejercer daños al DNA mitocondrial (Cadenas & Davis, 2000, Valko, et al., 2006). Además, estudios han mostrado que el envejecimiento en animales está asociado a la acumulación de formas oxidadas de proteínas celulares (Valko, et al., 2006), así como la declinación de los mecanismos reparadores celulares que se va desarrollando con el incremento de la edad.

Sin embargo, el proceso de envejecimiento no solo puede atribuirse a daños oxidativos por la producción de ERO, ya que se manifiesta como un fenómeno multifactorial como la degeneración en los telómeros cromosómicos, la dieta del organismo, el ambiente en el que se vive, etc.

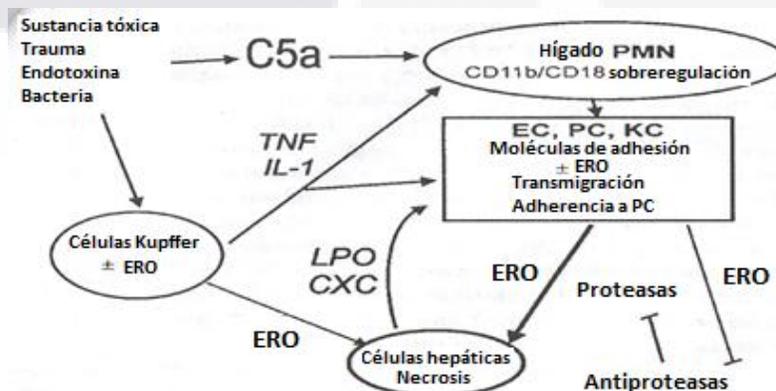
## II.2 Estrés Oxidativo hepático.

El hígado es un órgano sumamente importante ya que lleva a cabo numerosas funciones vitales para el adecuado funcionamiento del cuerpo. En él se lleva a cabo principalmente el metabolismo de sustancias químicas, razón por la cual el hígado es blanco de la acción de sustancias tóxicas que pueden actuar de manera negativa sobre dicho órgano.

Dentro de los diferentes mecanismos por los cuales se puede llegar a un hepatotoxicidad, se encuentran el daño oxidativo causado principalmente por ERO y RL de distintos tipos que pueden conllevar a daños y enfermedades que afecten la función de este órgano.

### II.2.1 Estrés oxidativo durante inflamación hepática.

Debido a que el hígado está en constante contacto con sustancias de distinta naturaleza, existen algunas de ellas que producen daños en el tejido hepático, lo que promueve la activación de células no parenquimatosas como las células de Kupffer y neutrófilos, los cuales son fuente de citocinas, quimiocinas, moléculas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, C5a), y ERO y RL, los cuales promueven un estado de estrés oxidativo durante el daño producido por sustancias tóxicas. (Jaeschke et al., 2002). En la **figura II.4** se muestra un esquema sobre los mecanismos generales de producción de estrés oxidativo que generan las células de Kupffer.



**Figura II.4.** Producción de ERO por las células de Kupffer. (Jaeschke, 2002).

### **II.2.2 Estrés oxidativo producido por CIP2E1**

El citocromo P<sub>450</sub> 2E1, puede ser inducido por varios tipos de drogas, lo que conlleva a la producción de ERO que genera estrés oxidativo y puede terminar en inactivaciones enzimáticas, lipoperoxidación en membranas, daño mitocondrial, entre otros. (Jaeschke, 2002).

### **II.3 Estrés Oxidativo Renal**

Los riñones son órganos de suma importancia ya que dentro de sus muchas funciones, mantienen el equilibrio entre la composición del medio interno con el externo, es decir, contribuyen principalmente en el mantenimiento de la homeostasis de las células del cuerpo, regulando el contenido de agua y electrolitos corporales, excretando sustancias de desecho, regulación de la presión arterial, eliminación de sustancias extrañas del organismo, reabsorción de sustancias útiles, regulación del equilibrio ácido-base, entre otras. (Jaramillo et al., 2006).

Por su elevada perfusión sanguínea y su capacidad para concentrar la orina, los riñones se exponen a concentraciones altas de xenobióticos lo que los hace más vulnerables al daño producido por estas sustancias, particularmente las células epiteliales de las nefronas. En este contexto, en la membrana del borde en cepillo de las células tubulares proximales se encuentran enzimas cuyas actividades pueden ser inicialmente dañadas por la exposición a los metales pesados. (Becerra, 2008) Por lo tanto es de esperarse efectos tóxicos en dicho tipo de células renales por nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, en las cual el Titanio es un metal pesado, el cual tiene efectos de producción de estrés oxidativo en células que se encuentran expuestas a este nanomaterial.

### **II.4 Las nanopartículas de Dióxido de Titanio (TiO<sub>2</sub>)**

El óxido de titanio (IV) o dióxido de titanio es un compuesto químico cuya fórmula es TiO<sub>2</sub>. Entre otras cosas, es utilizado en procesos de oxidación avanzada

fotocatalizadora. Se produce industrialmente en grandes cantidades y se utilizan como pigmentos y catalizadores y en la producción de materiales cerámicos. Tiene gran importancia como pigmento blanco por sus propiedades de dispersión, su estabilidad química y su no toxicidad, por lo que es el pigmento inorgánico más importante en términos de producción mundial. También, una de las sustancias químicas más blancas que existen: refleja prácticamente toda la radiación visible que le llega, y mantiene su color de forma permanente, y además es un fotocatalizador muy eficaz acelerando las reacciones químicas provocadas por la radiación luminosa.

Como ya se ha mencionado, los pigmentos de  $\text{TiO}_2$  se utilizan principalmente en la producción de pinturas y plásticos, así como en papel, tintas de impresión, cosméticos, productos textiles y alimentarios. Es el pigmento más habitualmente utilizado en el mundo, que proporciona a los productos finales una brillante blancura, opacidad y protección. Además se usa en la producción de pinturas que repelen la suciedad, vidrios que se limpian solos, en el sector de las artes gráficas (impresión) donde se opera con espesores de recubrimientos de menos de 100 micras.

También tiene aplicaciones en las fibras sintéticas, eliminando la apariencia grasosa causada por las propiedades translúcidas de la resina.

Otras áreas de aplicación del  $\text{TiO}_2$  incluyen la industria cerámica, la manufactura de cemento blanco y el coloreado de hule o linóleo, los pigmentos de  $\text{TiO}_2$  también se utilizan como absorbentes de rayos UV en productos para el bronceado, jabones, polvos cosméticos, cremas, pasta de dientes, papel de cigarro y la industria cosmética.

El  $\text{TiO}_2$  también se ha empleado como agente blanqueador y opacador en esmaltes de porcelana, dando un acabado final de gran brillo, dureza y resistencia al ácido, es además un pigmento blanco permanente que se emplea en pinturas, papel y plásticos, asimismo tiene una amplia gama de aplicaciones en la industria química en general. (<http://www.ibercordones.com>)

#### II.4.1 Las Nanopartículas como tratamiento para el cáncer.

En la actualidad, se han estado realizando investigaciones sobre el uso de nanopartículas en distintos campos de aplicación ya que la nanotecnología, promete ser muy importante en un futuro. Sin embargo existen muchos vacíos de información sobre todo en los efectos tóxicos que pudieran tener sobre los organismos que se expongan a ellas.

La nanotecnología, es un campo de estudio emergente que se ocupa de las interacciones de las moléculas y sustancias tales como fragmentos moleculares, átomos y moléculas. (Bharali et al., 2009). Según la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (NNI), las nanopartículas se definen en dimensiones de aproximadamente 1 a 100 nanómetros (nm), con un rango que se puede extender hasta 100nm. (Bharali et al., 2009). Dicho tamaño, permite que los materiales posean diferentes propiedades fisicoquímicas en comparación con partículas del mismo material a escala macrométrica. Entre las propiedades y características que varían se encuentra su mayor superficie área/volumen, lo que permite mayor reactividad e interacción con otras moléculas (catálisis, unión, reacciones), mayor dureza y resistencia al calor químico, presencia de transparencia y un paso sencillo a través de membranas celulares por su tamaño nanométrico. (Holister et al., 2003).

Actualmente, el cáncer es una enfermedad que afecta a millones de personas en el mundo, y los agentes terapéuticos que se han venido utilizando, generan un alto grado de toxicidad ya que afectan no solo células cancerígenas y sino también otros grupos de células que están completamente sanas, dando lugar a efectos secundarios graves no deseados como supresión de la médula ósea, pérdida de cabello (alopecia), y descamación del epitelio intestinal. (Bharali et al., 2009). Por lo tanto existe un gran interés el en desarrollo de nuevos tratamientos basados en la utilización de nanopartículas de Dióxido de Titanio ( $\text{TiO}_2$ ) en las cuales se aprovechan sus propiedades de escala nanométrica, para administrar el fármaco al tejido objetivo, liberar el fármaco a una velocidad controlada y minimizar lo más posible los efectos adversos como los mencionados anteriormente.

#### **II.4.2 Toxicidad de Nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.**

Las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), tienen muchas aplicaciones beneficiosas aprovechando su propiedad fotocatalizadora. (Hamilton et al., 2009). Con estudios anteriores, se ha demostrado que esta propiedad ha mostrado tener eficacia en la eliminación de células cancerígenas. (Thevenot et al., 2008). Por tal razón, el uso de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> presenta una opción para el tratamiento contra esta enfermedad que no ocasiona los efectos secundarios como los fármacos empleados hasta el momento.

Sin embargo, debido a la naturaleza metálica de estas nanopartículas, se debe tener bien claro el grado de toxicidad que pudieran tener estos nanomateriales, principalmente sobre órganos blanco como el hígado y riñón, debido a la manera en la cual se distribuyen por administración intravenosa que es la utilizada para los tratamientos contra el cáncer. En este contexto, las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> se acumulan principalmente en el hígado, luego a manera decreciente en bazo, pulmón y riñón, encontrándose la mayor retención en el hígado. (Fabian et al., 2008).

También se ha observado en estudios anteriores que las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> se distribuyen en varios tejidos como pulmón, bazo, riñón e hígado donde se tiene la mayor acumulación. (Johnston, et al., 2009).

En el caso del riñón, el principal efecto observado es la producción de ERO en células del túbulo proximal, lo que contribuye al principal efecto toxicológico en el funcionamiento celular. (Pujalte, 2011).

#### **II.4.3 Nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y la producción de estrés oxidativo.**

Uno de los principales efectos de la exposición a las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, es la producción de la respuesta inflamatoria con la infiltración de neutrófilos y macrófagos activados por mediadores de inflamación como IL-8 y TNF, en distintos órganos blanco, es decir, no existe un órgano específico de acción para estos nanomateriales (Johnston,

et al., 2009). Los neutrófilos tienen 2 mecanismos con los cuales llevan a cabo la eliminación de agentes extraños en los tejidos: 1) la producción de una explosión oxidativa en la cual los neutrófilos liberan gran cantidad de ERO que tienen la finalidad de atacar los agentes extraños y 2) la producción de varios compuestos proinflamatorios como citocinas y quimiocinas entre las cuales se encuentran la IL-8, IL-12 TNF- $\alpha$  TGF- $\beta$ , por mencionar algunos, los cuales a su vez conllevan a la activación de otras células del sistema inmune como los macrófagos que forman parte del proceso inflamatorio crónico (Goncalves, et al., 2011). En este sentido, esta respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo es uno de los principales efectos tóxicos que promueven las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Esto incluye la producción de ERO, el agotamiento de las defensas antioxidantes, aumento de los productos de la oxidación (lipoperoxidación), y pruebas en las que un pretratamiento con antioxidantes disminuye el estrés oxidativo. (Johnston, et al., 2009). Por lo tanto, el estrés oxidativo conduce a la respuesta inflamatoria y citotóxica, tomando en cuenta la concentración de partículas administradas y la duración del tratamiento. (Johnston, et al., 2009).

En relación con lo anterior, (Hedenborg, 1988), publicó que las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> inducen la producción de ERO por neutrófilos humanos, además, en estudios anteriores realizados en ratas se ha observado la generación del proceso inflamatorio en pulmón con la infiltración de neutrófilos durante el tratamiento con nanopartículas de TiO<sub>2</sub> por vía inhalatoria (Ferin, et al., 1992, Johnston, et al., 2009). Así mismo, también se ha observado respuesta inflamatoria con la infiltración de neutrófilos y macrófagos en pulmón de ratas, ratones y hamsters (Bermudez, et al., 2004, Johnston et al., 2009).

En estudios de exposición a nanopartículas por vía dérmica en humanos se ha observado poco o nada de penetración hacia la dermis de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, debido a que son retenidas por el estrato córneo de la piel. (Mavon et al., 2007, Kiss, et al., 2008, Johnston, et al., 2009).

En el caso de administración de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> vía intravenosa, como ya se ha mencionado, se ha observado que este compuesto se distribuye en la sangre y a partir de ella se almacena en órganos como hígado, bazo, pulmones y riñones (Fabian, et al., 2008, Johnston et al., 2009). En este contexto, se ha encontrado la producción de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ERO en exceso y reducción en la organización miofibrilar de miocitos cardiacos por la exposición nanopartículas de  $TiO_2$  (Helfenstein, et al., 2008), así como el mismo fenómeno en células de microglía del SNC expuestas a las nanopartículas mencionadas (Long, et al., 2006).

En el caso de administración de nanoparticulas por vía oral e intraperitoneal, no se tienen aún estudios suficientes que aporten datos comprobados al respecto.

Por otra parte, debido al mecanismo en el cual las nanopartículas de  $TiO_2$  al almacenarse en órganos blanco sobre todo durante la exposición por vía intravenosa provocan la infiltración de neutrófilos y la actividad de macrófagos, éstos inician la explosión oxidativa, mediante una producción en exceso de ERO hacia el tejido circundante, dañando de esta manera las células parenquimatosas generando la aparición de toxicidad por parte de dichas nanopartículas.

Por lo tanto, es de esperarse que exista una producción de estrés oxidativo en procesos inflamatorios en células hepáticas y renales expuestas a las nanopartículas de  $TiO_2$  utilizadas en los tratamientos contra el cáncer, ya que durante la distribución de estos nanomateriales, existe una acumulación y contacto directo con estos órganos. Por esta razón es importante obtener que efectos tóxicos pudieran producirse con estas nanopartículas, objetivo del presente estudio.

### III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer, es una de las enfermedades que actualmente causan un gran número de muertes en todo el mundo, acorde con la Sociedad Americana del Cáncer la probabilidad de desarrollar cáncer durante la vida de una persona es de 1 por cada 2 hombres y de 1 por cada 3 mujeres. (Bharali et al., 2009).

Los agentes quimioterapéuticos actuales son de bajo peso molecular, con un alto volumen farmacocinético de distribución, lo que contribuye a la citotoxicidad. (Bharali, 2009). Este bajo peso molecular hace que estos agentes terapéuticos sean fácilmente excretables, lo que hace que se necesiten concentraciones altas para su acción, además de que carecen de especificaciones y causan daños en células no cancerígenas, lo que contribuye a su toxicidad. (Bharali et al., 2009).

Al respecto, la nanotecnología es una disciplina que estudia materiales a escala nanométrica y su posible aplicación en distintas áreas científicas. En medicina, la nanotecnología ofrece aplicaciones en diversos campos. La base de estas aplicaciones radica en usar nanosistemas vectores que permitan introducir fármacos para dirigirlos a un órgano o tejido específico. Sin embargo, los posibles riesgos para la salud derivados del uso de los nanomateriales son aspectos poco conocidos. Al respecto, mientras que en los Estados Unidos de América se invierten aproximadamente 4500 millones de dólares por año en la investigación de nanomateriales, sólo el 5 % de esos fondos se destinan a evaluar sus riesgos. En Europa, la inversión anual para realizar estudios de nanomateriales alcanza los 600 millones de euros, pero la investigación sobre sus posibles efectos nocivos apenas alcanza los 24 millones de euros.

Una de las nanopartículas ampliamente utilizadas es el  $\text{TiO}_2$  sobre las cuales se han estado realizando investigaciones debido a su amplio uso comercial en la actualidad (Thevenot et al., 2008) y por ello, es importante conocer su toxicidad.

Estas nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  son recubiertas con agentes terapéuticos o su superficie es modificada con compuestos como glicol éter, vinileter, alanina, vinil ácido acético, los cuales proporcionan grupos funcionales de superficie  $\text{OH}^-$ ,  $\text{NH}_2$  y  $\text{COOH}$ .

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(Thevenot et al., 2008). Esta modificación a las nanopartículas se ha observado que ejercen un efecto citotóxico sobre las células cancerosas, especialmente tumores de próstata y carcinoma de pulmón de Lewis. (Thevenot et al., 2008).

Sin embargo, las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , se ha observado que pueden llegar a ser tóxicas en el organismo. Por ejemplo, se ha demostrado que pueden activar ERO en la interacción con las membranas celulares. En estudios in vivo mediante una administración oral, se ha demostrado que al entrar a la circulación sanguínea llegan a dañar el hígado y riñón. (Thevenot et al., 2008). También en administración peritoneal al diseminarse las nanopartículas en el cuerpo, éstas se depositan en órganos vitales como pulmón, bazo, hígado y riñón y pueden inducir inflamación severa pulmonar y enfisema. (Thevenot et al., 2008).

El daño hepático y renal así como el estrés oxidativo celular que pueden ser generados por el  $\text{TiO}_2$  han sido poco estudiados. Dado que en los humanos estos órganos participan de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal, cuando son afectados por los xenobióticos aparecen alteraciones patológicas que generan una calidad de vida muy baja o pueden conducir a la muerte. Al respecto, esta investigación puede contribuir a identificar la toxicidad hepática y renal del  $\text{TiO}_2$ .

Debido a estas razones, es sumamente importante el tener bien en claro que efectos tóxicos pueden tener las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  utilizadas para el tratamiento contra el cáncer, y de ahí radica el por qué y la importancia de realizar este estudio toxicológico enfocado en los efectos nocivos sobre órganos como hígado y riñón en los que dichas nanopartículas se depositan y por lo tanto pueden causar daños relacionados con el estrés oxidativo como la lipoperoxidación de membranas celulares de estos tipos de células.

#### IV. HIPOTESIS DE TRABAJO

La exposición del humano y de los animales a nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  produce daño en órganos y tejidos por la generación de estrés oxidativo celular.



## V. OBJETIVOS

### V.1 General

Analizar la generación de estrés oxidativo en el hígado y los riñones de ratas Wistar machos expuestos a nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y de  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ .

### V.2 Particulares

1. Evaluación de la toxicidad hepática del  $\text{TiO}_2$  y del  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  en ratas Wistar machos mediante:

1.1 Las actividades séricas de las transaminasas alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST).

1.2 Las concentraciones en sangre de albúmina y MDA.

1.3 Las concentraciones hepáticas de GSH, ATP y MDA.

1.4 Las alteraciones estructurales del hígado.

2. Evaluación de la toxicidad renal del  $\text{TiO}_2$  y del  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  en ratas Wistar machos mediante:

2.1 La concentración de creatinina en sangre.

2.2 El volumen urinario.

2.3 Las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y proteínas en la orina.

2.4 La concentración urinaria de glucosa.

2.5 Las concentraciones renales de GSH, ATP y MDA.

2.6 Las alteraciones estructurales de los riñones.

3) Registrar las dosis de exposición en las cuales se tiene efectos tóxicos sobre células hepáticas y renales.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1 Diseño Experimental

El estudio se realizó en ratas Wistar machos de 150-200 g de peso. Los animales fueron divididos en lotes de 10 ratas y tratados como se muestra en la tabla siguiente.

**Tabla VI.1.** Descripción del diseño experimental utilizado

<b>Testigos</b>	<b>Tratados TiO<sub>2</sub></b>	<b>Tratados TiO<sub>2</sub>/Ag</b>
<p style="text-align: center;">↓</p> <p>* Administración de solución salina (vía i.v.)</p> <p>* Obtención de muestras de sangre de la arteria caudal (1, 14 y 28 días) y cuantificar: concentraciones de albúmina, MDA y creatinina.</p> <p>* A los 28 días, se colocaron a las ratas en jaulas metabólicas y se colectaron muestras de orina (24 horas). Realización las pruebas programadas en orina.</p>	<p style="text-align: center;">↓</p> <p>* Administración de TiO<sub>2</sub> (5 mg/Kg, i.v.)</p> <p>* Obtención de muestras de sangre de la arteria caudal (1, 14 y 28 días) y cuantificar: concentraciones de albúmina, MDA y creatinina.</p> <p>* A los 28 días, se colocaron a las ratas en jaulas metabólicas y se colectaron muestras de orina (24 horas). Realización las pruebas programadas en orina.</p>	<p style="text-align: center;">↓</p> <p>* Administración de TiO<sub>2</sub>/Ag (5 mg/Kg, i.v.)</p> <p>* Obtención de muestras de sangre de la arteria caudal (1, 14 y 28 días) y cuantificar: concentraciones de albúmina, MDA y creatinina.</p> <p>* A los 28 días, se colocaron a las ratas en jaulas metabólicas y se colectaron muestras de orina (24 horas). Realización las pruebas programadas en orina.</p>
<p style="text-align: center;">↓</p> <p>Sacrificio de animales</p> <p>* Cuantificación de MDA,</p>	<p style="text-align: center;">↓</p> <p>Sacrificio de animales</p> <p>* Cuantificación de MDA,</p>	<p style="text-align: center;">↓</p> <p>Sacrificio de animales</p> <p>* Cuantificación de MDA,</p>

GSH y ATP en hígado y riñones.	GSH y ATP en hígado y riñones.	GSH y ATP en hígado y riñones.
* Estudio histológico del tejido hepático y renal.	* Estudio histológico del tejido hepático y renal.	* Estudio histológico del tejido hepático y renal.

**VI.2 Parámetros evaluados:**

**Tabla VI.2.** Descripción de los parámetros, evaluados durante la experimentación

<b>Parámetro</b>	<b>Método</b>	<b>Justificación</b>
* Actividades séricas de ALT y de AST.	Schlebusch, et al., 1974.	Marcadores de necrosis de células hepáticas.
* Concentración de albúmina en sangre.	Doumas et al., 1971.	Marcador bioquímico de daño hepático.
* Concentraciones de GSH en hígado y corteza renal.	Cohn y Lyle, 1966.	Valora la capacidad antioxidante de las células hepáticas y renales.
* Concentraciones de ATP en hígado y corteza renal.	Adams, 1963.	Valora la reserva de sustancias energéticas del metabolismo en hepatocitos y células renales.
* Concentración de creatinina en sangre.	Bauer, 1982.	Prueba útil para valorar la filtración glomerular.
* Volumen urinario.	Volumétrico	Marcador de función renal.
* Concentración de proteínas en la orina.	Peterson, 1977.	Identifica alteraciones fisiopatológicas renales, como el daño glomerular.
* Concentración urinaria de sodio.	Flamométrico.	Valora el manejo renal de electrolitos.
* Concentración de glucosa en orina.	Trinder, 1969.	Marcador funcional de células tubulares proximales.

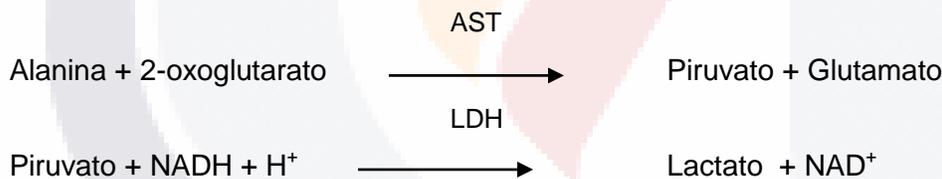
* Estudio histológico de hígado y riñones.	Tinción H/E y análisis por microscopía óptica.	Identifica daño estructural producido por los xenobióticos en hepatocitos y células renales.
--	--	--

Los resultados que se obtengan serán analizados estadísticamente con las pruebas de ANOVA y de Tukey-Kramer.

### VI.3 Fundamentos de los métodos

#### I) Actividades séricas ALT y AST

La Alanina aminotransferasa (ALT) cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al 2-oxoglutarato, formando piruvato y glutamato. La concentración catalítica se determina empleando la reacción acoplada de la lactato deshidrogenada (LDH), a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340nm (Schlebusch, et al., 1974).



La aspartato aminotransferasa (AST) cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al 2-oxoglutarato, formando oxalacetato y glutamato. La concentración catalítica se determina empleando la reacción acoplada a la malato deshidrogenada (MDH), a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340nm (Schlebusch, et al., 1974).



II) Concentración de albúmina en sangre.

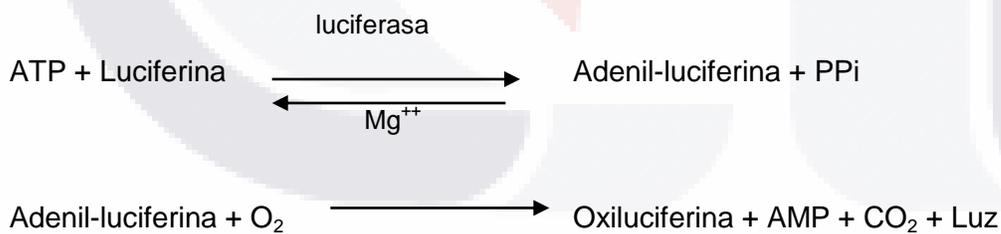
La albúmina presente en la muestra reacciona con el verde de bromocresol en medio ácido, originando un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría (Doumas et al., 1971).

III) Concentración y GSH en hígado y corteza renal.

El GSH presente en los tejidos, se cuantifica aprovechando la reacción del GSH con el reactivo  $\alpha$ -phthalaldehyde (OPT), por medio de la emisión de fluorescencia, ya que dicho reactivo es un agente fluorescente ( Cohn y Lyle, 1966).

IV) Concentración de ATP en hígado y corteza renal

El ATP es esencial para la producción de luz en la reacción de bioluminiscencia de la luciérnaga, y por lo tanto se estableció un procedimiento muy sensible para su cuantificación, en el cual el ATP al consumirse, se emite luz cuando la luciferasa de la luciérnaga cataliza la oxidación de la d-luciferina (Adams, 1963).



Debido a que el ATP es el reactivo que limita la reacción, la luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP en la muestra analizada.

#### V) Concentración de creatinina en sangre.

La creatinina presente en la muestra reacciona con el picrato en medio alcalino originando un complejo coloreado. Se mide la velocidad de formación de dicho compuesto en períodos iniciales cortos, evitándose así la interferencia a otros compuestos (Bauer, 1982).

#### VI) Volumen urinario

El volumen urinario se mide por medio de volumetría, en el cual un volumen alto puede estar asociado una falta de reabsorción de líquido por parte de las nefronas, y por el contrario, un volumen bajo puede estar asociado a fallas renales en el proceso de filtración por medio de los capilares glomerulares.

#### VII) Concentración de proteínas en orina.

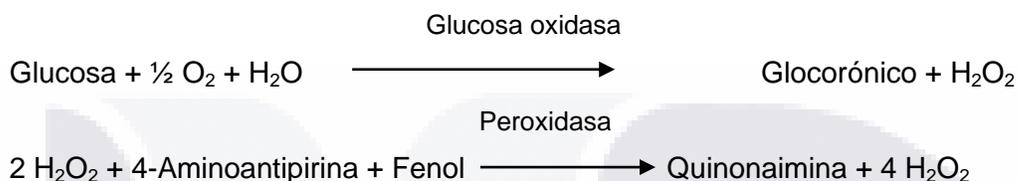
La proteína presente en la muestra reacciona con el rojo de pirogalol y el molbdato en medio ácido, originando un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría (Peterson, 1977).

#### VIII) Concentración urinaria de Sodio (Na).

El Na presente en la orina se cuantifica por el método flamométrico, en el cual la atomización de la muestra disuelta sobre la flama, hace que los electrones de los átomos, pasen a niveles energéticos superiores y que al volver a su estado inicial, se produzca cierta cantidad de luz producida por el elemento excitado, la cual es medida por medio del flamómetro.

IX) Concentración de glucosa en orina.

La glucosa presente en la muestra origina, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría (Trinder, 1969).



X) Estudio histológica de hígado y riñones

Por medio de técnicas de tinción y análisis por microscopia óptica, se identifican anomalías en el tejido hepático y renal que pueden proporcionar información sobre el grado de daño estructural producido por xenobióticos en los hepatocitos y células renales.

## VII. RESULTADOS

Al **1er día de tratamiento** de las ratas con nanopartículas de  $TiO_2$  o de  $TiO_2/Ag$ , se obtuvieron los siguientes resultados.

### VII.1. Peso de las ratas (g).

Con respecto al grupo control, en el primer día de tratamiento, el peso de los animales tratados con  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  disminuyó significativamente: 8% y 7% respectivamente ( $P < 0.05$ ). En relación al 14 día de tratamiento, el peso de los animales tratados con  $TiO_2/Ag$  disminuyó significativamente en aproximadamente 15% ( $P < 0.05$ ). Por último al final de los 28 días de tratamiento, el peso corporal de las ratas tratadas con ambos tratamientos, no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control.

**Tabla VII.1.** Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/kg, i.v.) sobre el peso corporal de ratas Wistar machos a los 1, 14 y 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m).

<b>Peso de las ratas (g)</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 14</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 9)	258 $\pm$ 4.7	284 $\pm$ 6.6	275 $\pm$ 5.8
Tratamiento con $TiO_2$ (n = 6)	239 $\pm$ 3.2	263 $\pm$ 5.2	264 $\pm$ 6.4
Tratamiento con $TiO_2/Ag$ (n = 9)	241 $\pm$ 3.7	243 $\pm$ 6.1 (n = 6)	262 $\pm$ 5.3

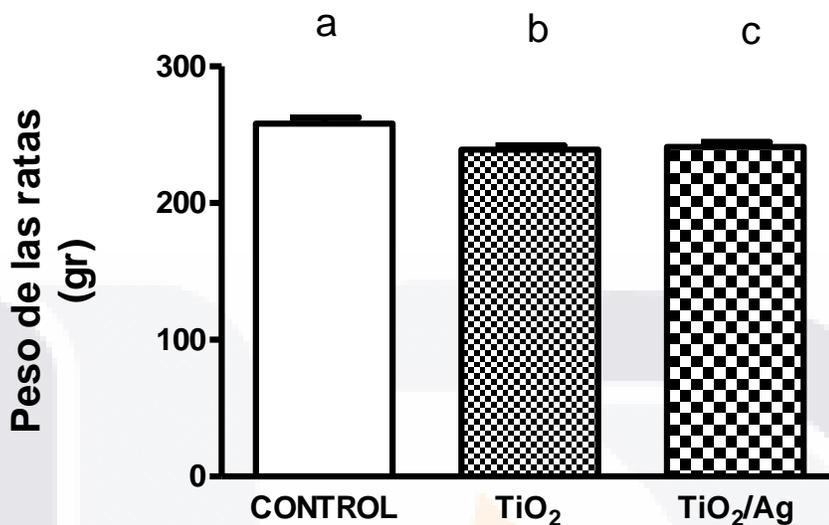


Figura VII.1.1. Peso corporal de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a las 24h) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv, a las 24h). Se expresan los valores medios (±eem), (a-b, a-c, P<0.05).

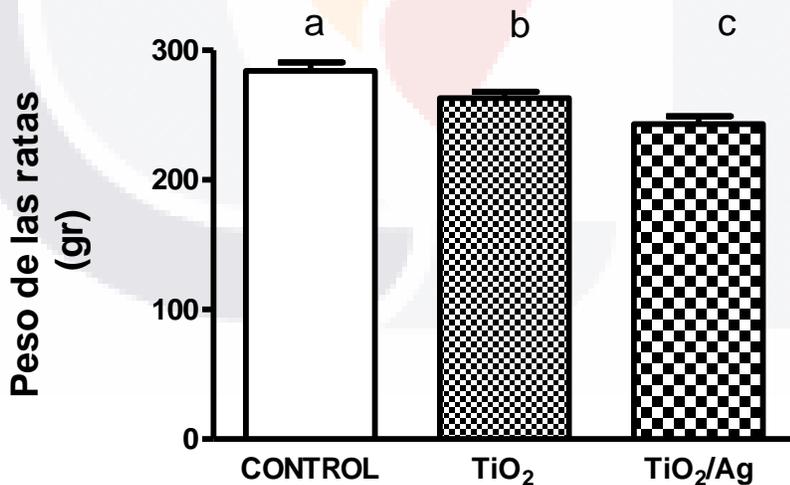


Figura VII.1.2. Peso corporal de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 14 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv, a los 14 días). Se expresan los valores medios (±eem), (a-c P<0.001).

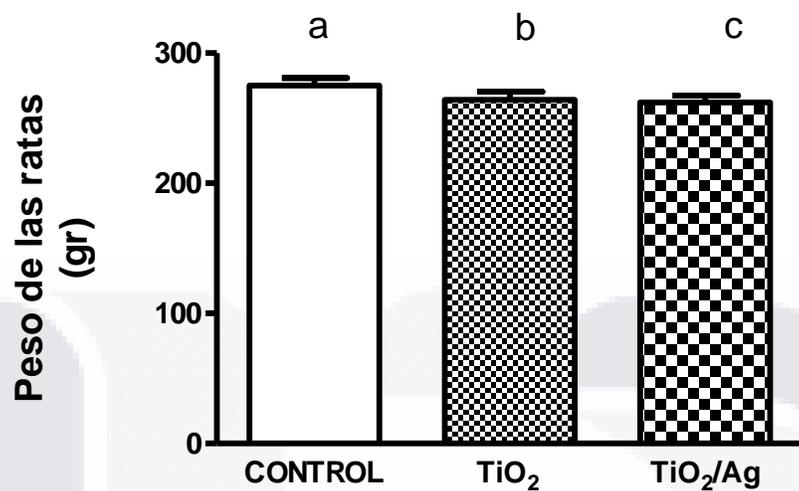


Figura VII.1.3. Peso corporal de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 28 días). Se expresan los valores medios ( $\pm$ em).

## VII.2. Concentración de Albúmina en sangre (gr/dL).

La concentración de albúmina en sangre en el 1° y 14° día, no presentó cambios significativos entre los grupos estudiados, aunque la tendencia fue la disminución de dicho parámetro en los dos tratamientos utilizados. Sin embargo, para el día 28°, la concentración de albúmina en sangre aumentó significativamente en un 46% en el grupo tratado con TiO<sub>2</sub>/Ag (P<0.01), con respecto al grupo control. Asimismo, también se presentó un aumento significativo en un 35% entre el grupo tratado con TiO<sub>2</sub> y el tratado con TiO<sub>2</sub>/Ag (P<0.05).

**Tabla VII.2** Efecto de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de albúmina en sangre de ratas Wistar machos a los 1, 14 y 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m).

<b>Albúmina en sangre (g/dL)</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 14</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 12)	1.54 $\pm$ 0.17	1.56 $\pm$ 0.17	1.05 $\pm$ 0.06 (n = 9)
Tratamiento con TiO <sub>2</sub> (n = 6)	1.21 $\pm$ 0.05	1.36 $\pm$ 0.09	1.13 $\pm$ 0.08
Tratamiento con TiO <sub>2</sub> /Ag (n = 9)	1.22 $\pm$ 0.06	1.19 $\pm$ 0.04 (n = 6)	1.53 $\pm$ 0.14

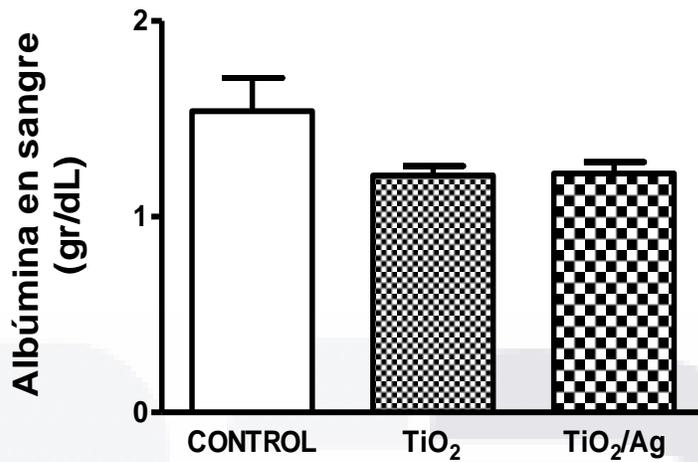


Figura VII.2.1. Concentración de albúmina en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a las 24h) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv, a las 24h). Se expresan los valores medios ( $\pm$ eem).

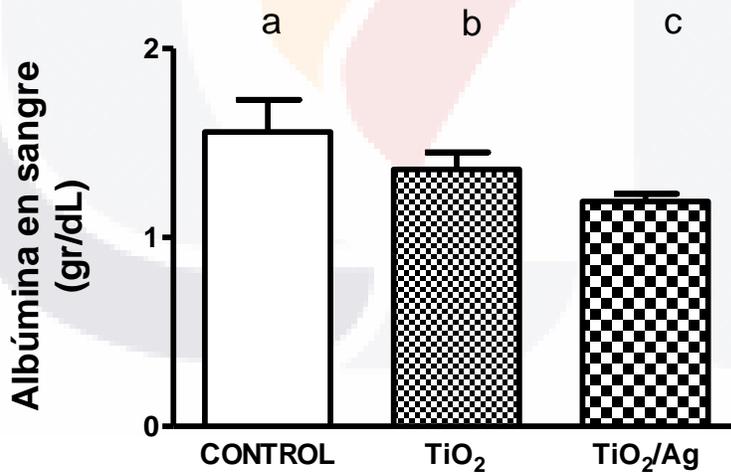


Figura VII.2.2 Concentración de albúmina en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 14 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv, a los 14 días). Se expresan los valores medios ( $\pm$ eem).

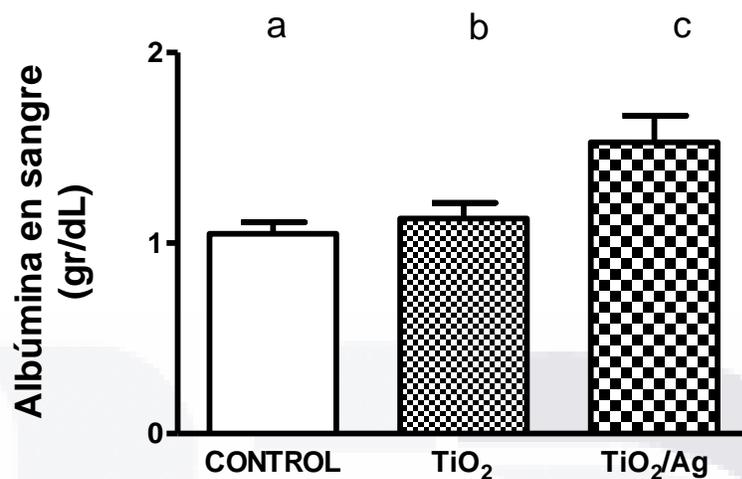


Figura VII.2.3. Concentración de albúmina en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv, a los 28 días). Se expresan los valores medios ( $\pm$ eem), (a-c P<0.01, b-c P<0.05).

### VII.3. Concentración de creatinina en sangre (mg/dL).

La concentración de creatinina en sangre en el 1° día de tratamiento, se encontró dentro del rango considerado como normal (0.6-1.3 mg/dL). Sin embargo, se encontró una disminución significativa en un 41% en este parámetro por parte del grupo tratado con TiO<sub>2</sub>/Ag con respecto al grupo tratado con TiO<sub>2</sub> (P<0.01). Para el 14° día, la concentración de creatinina en sangre, presentó una disminución significativa en un 39% (P<0.05) y 42% (P<0.01) por parte de los grupos tratados con TiO<sub>2</sub> y con TiO<sub>2</sub>/Ag respectivamente con respecto al grupo control. No obstante, los valores de los grupos tratados están muy cercanos a los valores estándar. Por último para el día 28° la concentración de creatinina en sangre aumentó significativamente en un 30% en el grupo tratado con TiO<sub>2</sub> (P<0.05) con respecto al grupo control, sin embargo, todos los valores están muy cerca de los valores estándar para este parámetro.

**Tabla VII.3** Efecto de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de creatinina en sangre de ratas Wistar machos a los 1, 14 y 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m).

<b>Creatinina en sangre (mg/dL)</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 14</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 12)	0.89 $\pm$ 0.09	0.83 $\pm$ 0.08	0.56 $\pm$ 0.04 (n = 9)
Tratamiento con TiO <sub>2</sub> (n = 6)	1.07 $\pm$ 0.08	0.51 $\pm$ 0.03	0.73 $\pm$ 0.06
Tratamiento con TiO <sub>2</sub> /Ag (n = 9)	0.63 $\pm$ 0.05	0.48 $\pm$ 0.04 (n = 6)	0.53 $\pm$ 0.03

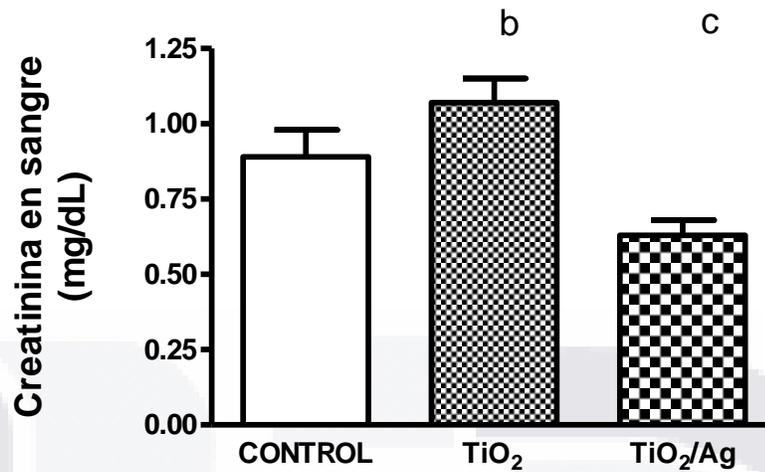


Figura VII.3.1. Concentración en sangre de creatinina en ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a las 24h) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv, a las 24h). Se expresan los valores medios ( $\pm$ eem), (b-c, P<0.01).

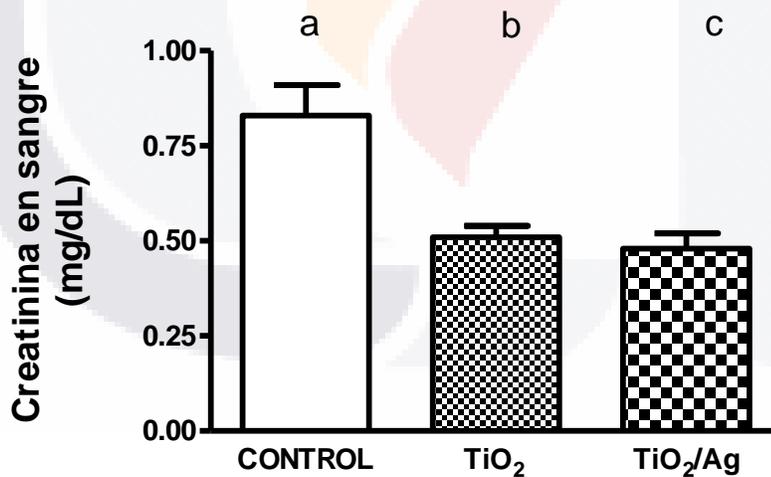


Figura VII.3.2. Concentración de creatinina en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 14 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 14 días). Se expresan los valores medios ( $\pm$ eem), (a-b P<0.05, a-c P<0.01).

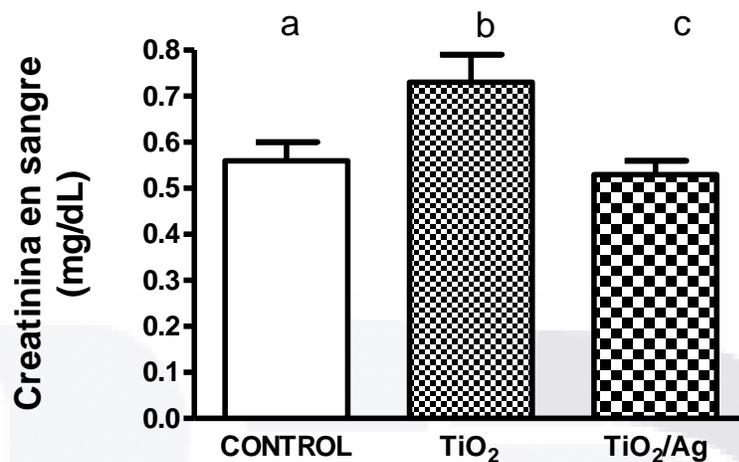


Figura VII.3.3. Concentración de creatinina en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv, a los 28 días). Se expresan los valores medios ( $\pm$ seem), (a-b P<0.05).

#### VII.4. Concentración de malondialdehído en sangre (nm/ml).

La concentración de malondialdehído en sangre al 1° día de tratamiento, presentó una disminución significativa en un 53% ( $P < 0.01$ ) y en un 39% ( $P < 0.01$ ) en los grupos tratados con  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  respectivamente con respecto al grupo control. Para el día 14, la concentración de este parámetro tuvo un aumento altamente significativo en un 175% ( $P < 0.001$ ), en el grupo tratado con  $TiO_2/Ag$  con respecto al grupo control. De igual forma, se tuvo un aumento altamente significativo en un 120% ( $P < 0.001$ ), entre el grupo tratado con  $TiO_2/Ag$  con respecto al grupo tratado con  $TiO_2$ . Por último, al 28° día, este parámetro aumentó significativamente en un 81% ( $P < 0.01$ ) y un 67% ( $P < 0.01$ ), para el grupo tratado con  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  respectivamente, con respecto al grupo control.

**Tabla VII.4** Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de MDA en sangre de ratas Wistar machos a los 1, 14 y 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m).

Malondialdehído en sangre (nm/ml)			
Grupo	Día 1	Día 14	Día 28
Control negativo (n = 9)	99.81 $\pm$ 5.36	41.25 $\pm$ 3.27	52.45 $\pm$ 5.73
Tratamiento con $TiO_2$ (n = 6)	46.68 $\pm$ 3.97	51.56 $\pm$ 10.31	95.01 $\pm$ 11.81
Tratamiento con $TiO_2/Ag$ (n = 9)	60.86 $\pm$ 7.37	113.25 $\pm$ 10.15 (n = 6)	87.46 $\pm$ 5.51

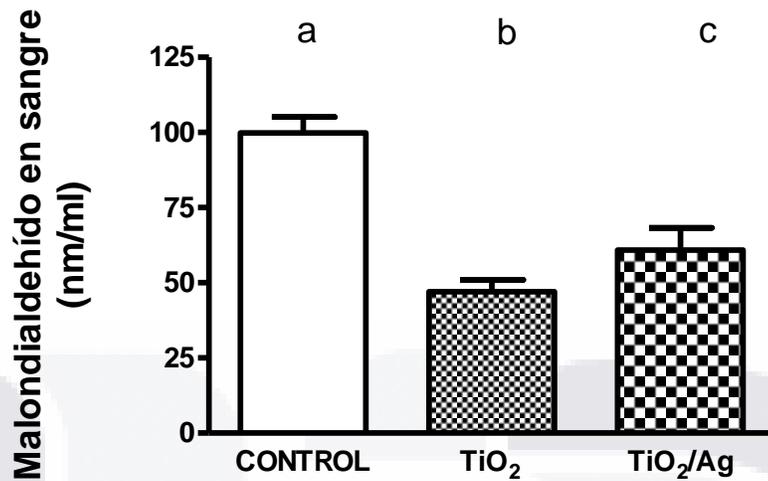


Figura VII.4.1. Concentración de malondialdehído en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv, a las 24 h) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv, a las 25 h). Se expresan los valores medios ( $\pm$ eem), (a-b, a-c P<0.01).

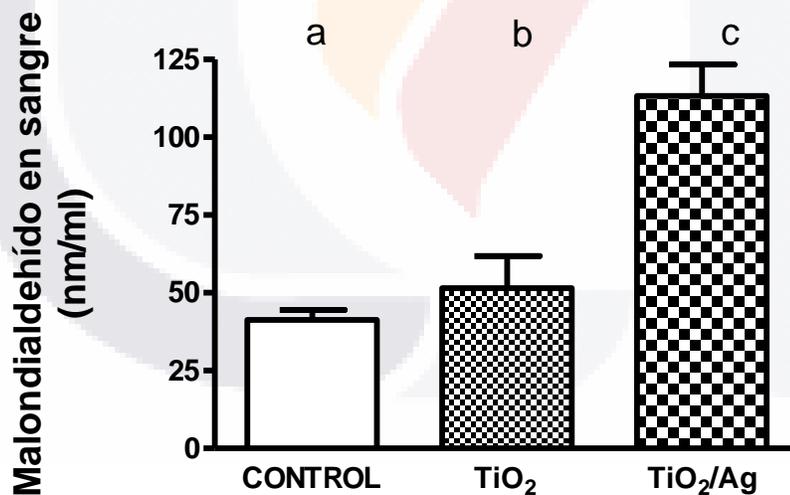


Figura VII.4.2. Concentración de malondialdehído en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 14 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 14 días). Se expresan los valores medios ( $\pm$ eem), (a-c P<0.001, b-c P<0.001).

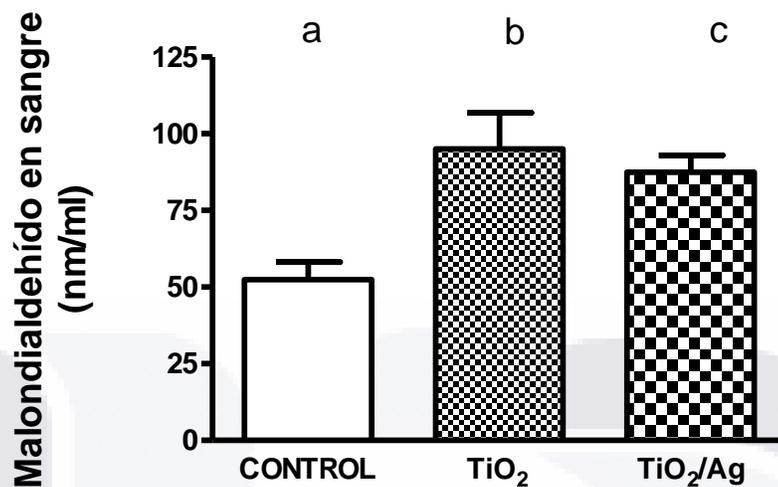


Figura VII.4.3. Concentración de malondialdehído en sangre en ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 28 días). Se expresan los valores medios (±eem), (a-b P<0.01, a-c P<0.01).

**VII.5. Concentración de transaminasa alanino aminotransferasa (ALT) (U/L).**

La concentración de ALT a los 28 días de tratamiento, no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control. Por otro lado, comparando ambos tratamientos entre sí, si se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0.5$ ).

**Tabla VII.5** Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración sanguínea de ALT en ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m).

<b>Concentración de ALT (U/L)</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 6)	56.17 $\pm$ 4.80
Tratamiento con $TiO_2$ (n = 7)	60.86 $\pm$ 1.78
Tratamiento con $TiO_2/Ag$ (n = 9)	46.14 $\pm$ 4.16

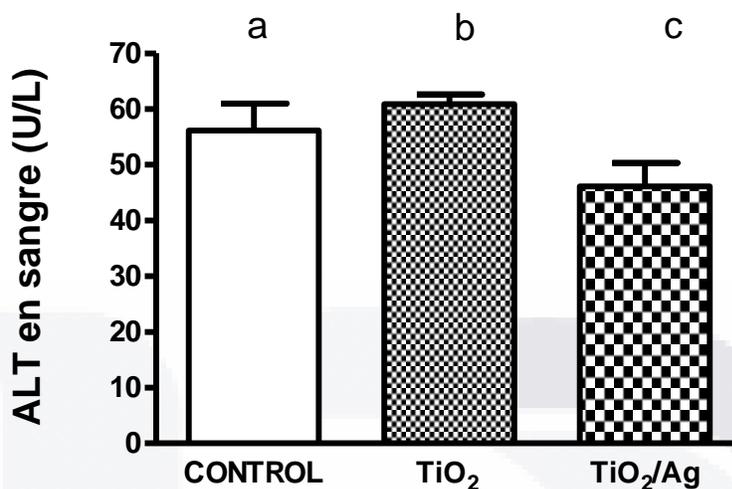


Figura VII.5.1. Concentración de ALT en sangre de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 28 días).

Se expresan los valores medios ( $\pm$  eem), (b-c P<0.05)

## VII.6. Concentración de transaminasa Aspartato aminotransferasa (AST) (U/L).

La concentración de AST a los 28 días de tratamiento, tuvo un aumento significativo ( $P < 0.5$ ), en un 25% por parte del grupo tratado con  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ , con respecto al grupo control. Asimismo, este mismo fenómeno se presentó al comparar el tratamiento con  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  con el tratamiento con  $\text{TiO}_2$ .

**Tabla VII.6** Efecto de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración sanguínea de AST en ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m).

Concentración de AST (U/L)	
Grupo	Día 28
Control negativo (n = 6)	78.67 $\pm$ 3.20
Tratamiento con $\text{TiO}_2$ (n = 7)	78 $\pm$ 2.40
Tratamiento con $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ (n = 9)	98.43 $\pm$ 6.95

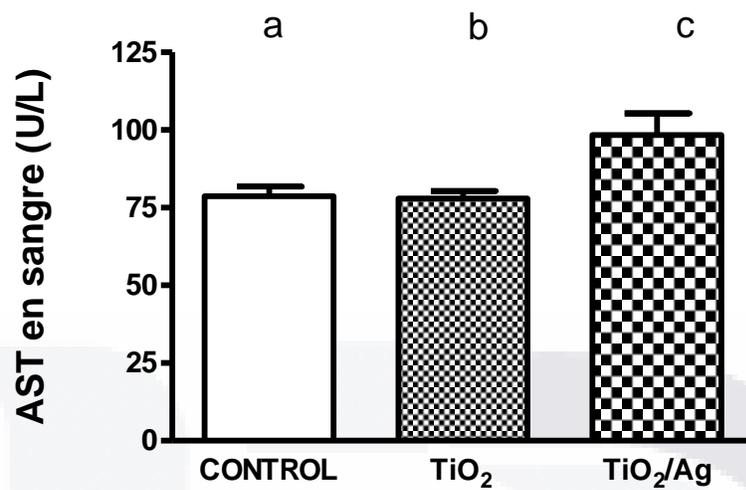


Figura VII.6.1. Concentración de AST en sangre de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 28 días). Se expresan los valores medios ( $\pm$  eem), (a-c, b-c P<0.05)

**VII. 7. Flujo urinario (ml/hr)**

El flujo urinario obtenido en los grupos tratados con  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  a los 28 días de tratamiento, no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control.

**Tabla VII.7** Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre el flujo urinario de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m).

<b>Flujo Urinario (ml/hr)</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 7)	0.67 $\pm$ 0.18
Tratamiento con $TiO_2$ (n = 6)	0.86 $\pm$ 0.18
Tratamiento con $TiO_2/Ag$ (n = 9)	0.51 $\pm$ 0.10

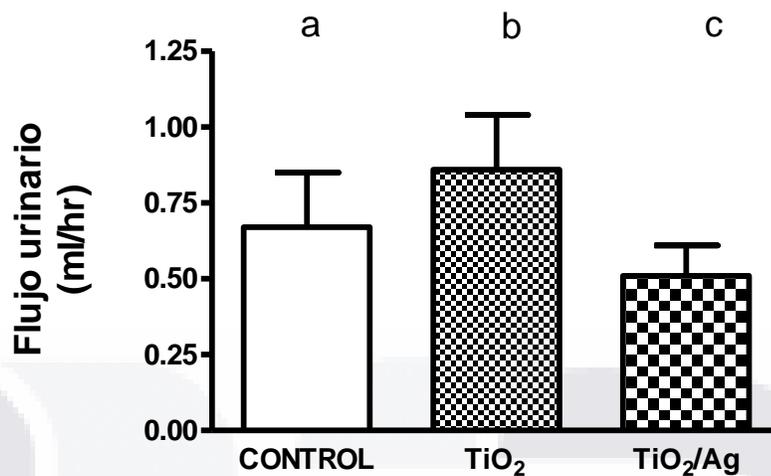


Figura VII.7.1. Flujo urinario de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 28 días). Se expresan los valores medios (±eem).

**VII. 8. Masa excretada de glucosa en orina (mg/hr)**

La cantidad de masa excretada de glucosa en orina por parte de los grupos tratados con  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  a los 28 días, no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control.

**Tabla VII.8.** Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la cantidad de masa excretada de glucosa en orina en ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m).

<b>Masa excretada de glucosa en orina (mg/hr)</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 7)	0.030 $\pm$ 0.016
Tratamiento con $TiO_2$ (n = 6)	0.020 $\pm$ 0.002
Tratamiento con $TiO_2/Ag$ (n = 9)	0.019 $\pm$ 0.003

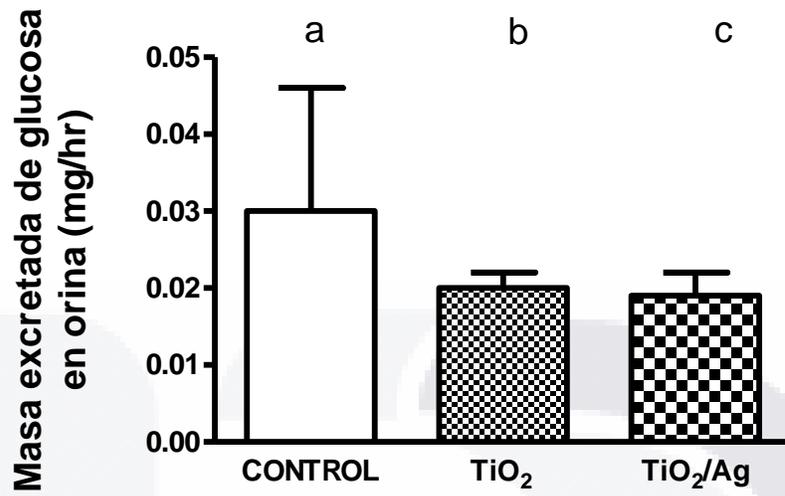


Figura VII.8.1. Masa excretada de glucosa en orina de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 28 días). Se expresan los valores medios ( $\pm$ eem).

**VII.9. Masa excretada de proteínas en orina (mg/hr)**

La cantidad de masa excretada de proteínas en orina al 28° día por parte del grupos tratados con  $TiO_2$  y con  $TiO_2/Ag$  aumento en ambos tratamientos, siendo de manera significativa en un 89% para el grupo tratado con  $TiO_2$  ( $P < 0.01$ ), y en menor proporción en un 26% para el grupo tratado con  $TiO_2/Ag$ , con respecto al grupo control. Asimismo, el aumento del tratamiento con  $TiO_2$ , fue significativamente mayor en un 56% con respecto al tratamiento con  $TiO_2/Ag$  ( $P < 0.05$ ).

**Tabla VII.9.** Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la cantidad de masa excretada de proteínas en orina en ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m).

<b>Masa excretada de proteínas en orina (mg/hr)</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 7)	0.335 $\pm$ 0.064
Tratamiento con $TiO_2$ (n = 6)	0.632 $\pm$ 0.054
Tratamiento con $TiO_2/Ag$ (n = 9)	0.404 $\pm$ 0.045

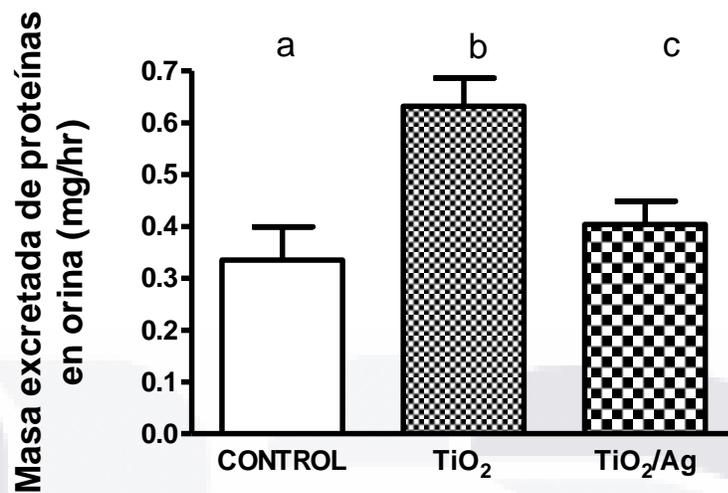


Figura VII.9.1. Masa excretada de proteínas en orina de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 28 días). Se expresan los valores medios (±eem), (a-b P<0.01, b-c P<0.05)

**VII. 10. Masa excretada de Sodio (Na), en orina (meq/hr)**

La cantidad de masa excretada de Na en orina presentó un aumento por parte de los grupos tratados con  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  con respecto al grupo control, con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) por parte del grupo tratado con  $TiO_2/Ag$ .

**Tabla VII.10** Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la cantidad de masa excretada de Na en orina en ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m).

<b>Masa excretada de Na en orina (meq/hr)</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 7)	0.022 $\pm$ 0.004
Tratamiento con $TiO_2$ (n = 6)	0.029 $\pm$ 0.004
Tratamiento con $TiO_2/Ag$ (n = 9)	0.404 $\pm$ 0.045

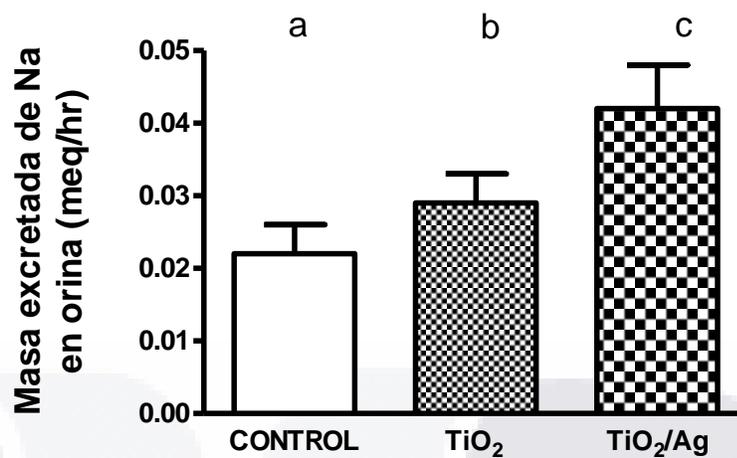


Figura VII.10.1. Masa excretada de Sodio (Na), en orina de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 28 días). Se expresan los valores medios ( $\pm$ sem), (a-c P<0.05)

**VII. 11. Concentración de glutatión (GSH) en hígado. ( $\mu\text{g}/\text{gr}$  de tejido).**

La concentración de GSH en hígado en los grupos tratados con  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  a los 28 días de tratamiento, no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control.

**Tabla VII.11.** Efecto de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de GSH en hígado de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m).

<b>Concentración de GSH en hígado (<math>\mu\text{g}/\text{gr}</math> de tejido)</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 9)	1199.38 $\pm$ 145.92
Tratamiento con $\text{TiO}_2$ (n = 6)	1213.23 $\pm$ 32.39
Tratamiento con $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ (n = 9)	1031.47 $\pm$ 133.67

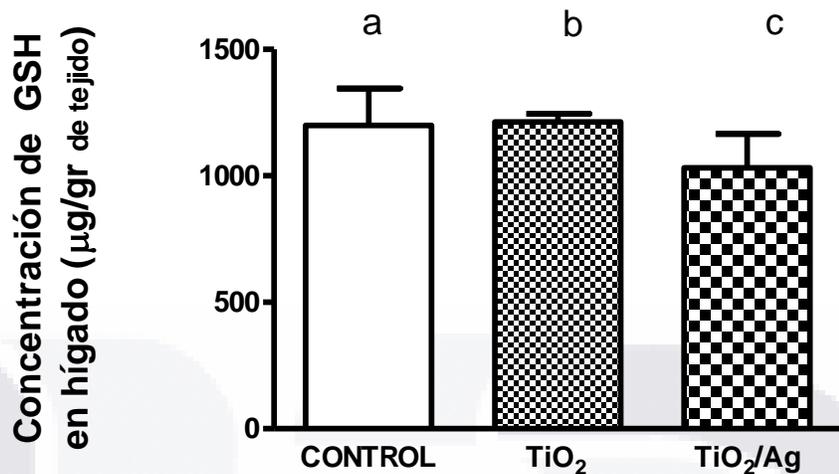


Figura VII.11.1. Concentración de GSH en hígado de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 28 días). Se expresan los valores medios (±eem).

**VII.12. Concentración de glutatión (GSH) en riñón ( $\mu\text{g}/\text{gr}$  de tejido).**

La concentración de GSH en riñón los 28 días de tratamiento en los grupos tratados con  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  tuvo una disminución altamente significativa en un 21% ( $P < 0.001$ ), y en un 68% ( $P < 0.001$ ) respectivamente con respecto al grupo control. Asimismo, al comparar los 2 tratamientos, se obtuvo una disminución significativa en un 59% para el tratamiento con  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  con respecto al tratamiento con  $\text{TiO}_2$  ( $P < 0.001$ ).

**Tabla VII.12.** Efecto de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de GSH en riñón de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m).

<b>Concentración de GSH en riñón (<math>\mu\text{g}/\text{gr}</math> de tejido)</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 9)	631.24 $\pm$ 23.16
Tratamiento con $\text{TiO}_2$ (n = 6)	498.76 $\pm$ 29.08
Tratamiento con $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ (n = 9)	204.9 $\pm$ 10.50

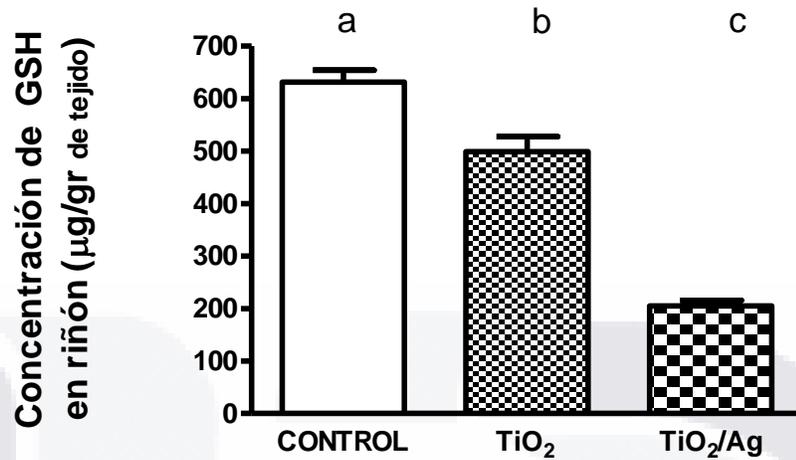


Figura VII.12.1. Concentración de GSH en riñón de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 28 días).

Se expresan los valores medios ( $\pm$ sem), (a-b P<0.001, a-c P<0.001, b-c P<0.001)

**VII.13. Concentración de Malondialdehído (MDA) en hígado (nm/100mg de tejido)**

La concentración de MDA en hígado a los 28 días de tratamiento en los grupos tratados con TiO<sub>2</sub> y con TiO<sub>2</sub>/Ag, no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control.

**Tabla VII.13.** Efecto de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de MDA en hígado de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios ( $\pm$  e.e.m).

<b>Concentración de MDA en hígado (nm/100mg de tejido)</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 9)	625.49 $\pm$ 110.41
Tratamiento con TiO <sub>2</sub> (n = 6)	565.09 $\pm$ 75.24
Tratamiento con TiO <sub>2</sub> /Ag (n = 9)	565.66 $\pm$ 70.75

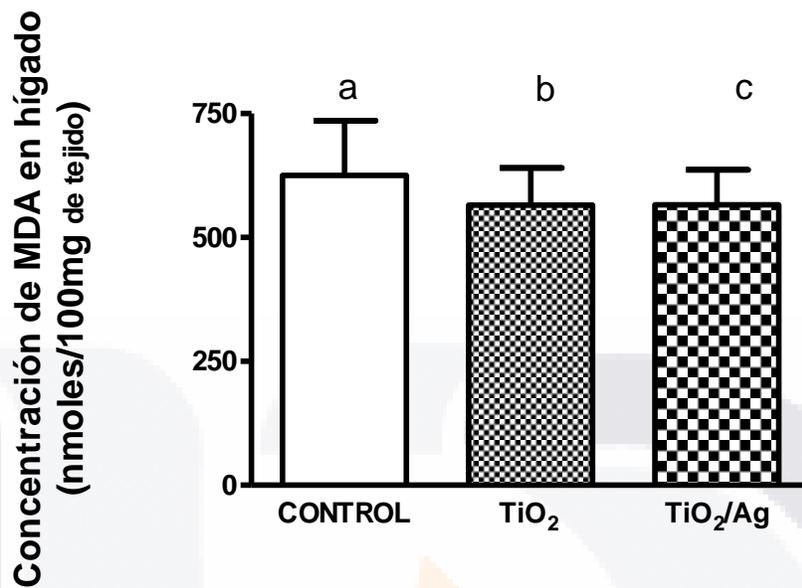


Figura VII.13.1. Concentración de MDA en hígado de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 28 días). Se expresan los valores medios ( $\pm$ sem)

**VII. 14. Concentración de Malondialdehído (MDA) en riñón (nm/100mg de tejido)**

La concentración de MDA en riñón a los 28 días de tratamiento en los grupos tratados con TiO<sub>2</sub> y con TiO<sub>2</sub>/Ag, no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control. Sin embargo la tendencia fue un aumento en los grupos tratados con respecto al grupo control en dicho parámetro.

**Tabla VII.14.** Efecto de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de MDA en riñón de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios (± e.e.m).

<b>Concentración de MDA en riñón (nm/100mg de tejido)</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 9)	206.76 ± 11.03
Tratamiento con TiO <sub>2</sub> (n = 6)	256.47 ± 22.76
Tratamiento con TiO <sub>2</sub> /Ag (n = 9)	224.46 ± 16.87

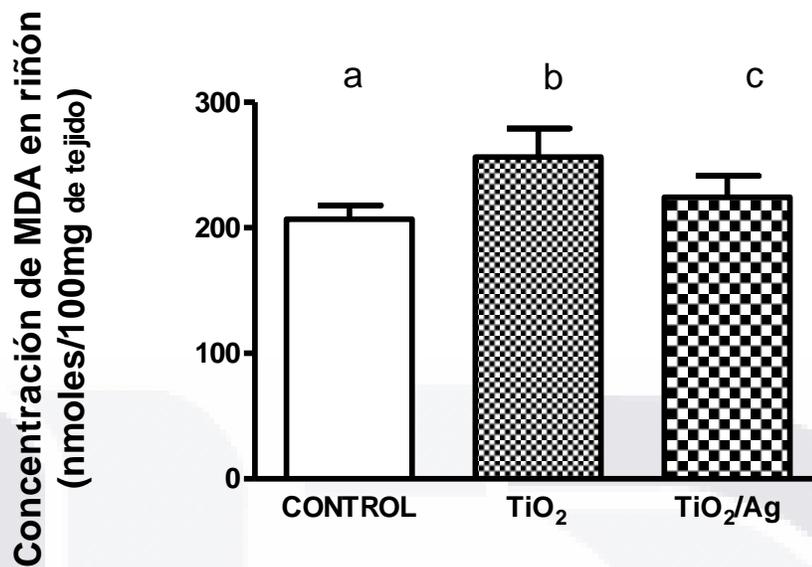


Figura VII.14.1. Concentración de MDA en riñón de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 28 días). Se expresan los valores medios (±eem)

**VII.15. Concentración de Trifosfato de adenosina (ATP) en hígado (nm/100mg de tejido).**

La concentración de ATP en hígado a los 28 días de tratamiento por parte del grupo tratado con TiO<sub>2</sub>, disminuyó significativamente en un 29% con respecto al grupo control (P<0.05). Asimismo, comparando ambos tratamientos, la disminución del grupo tratado con TiO<sub>2</sub> fue de un 32% con respecto al grupo tratado con TiO<sub>2</sub>/Ag (P<0.05).

**Tabla VII.15.** Efecto de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de ATP en hígado de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios (± e.e.m).

<b>Concentración de ATP en hígado (nm/100mg de tejido)</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 9)	103.05 ± 6.41
Tratamiento con TiO <sub>2</sub> (n = 6)	77.16 ± 3.69
Tratamiento con TiO <sub>2</sub> /Ag (n = 9)	108.13 ± 7.99

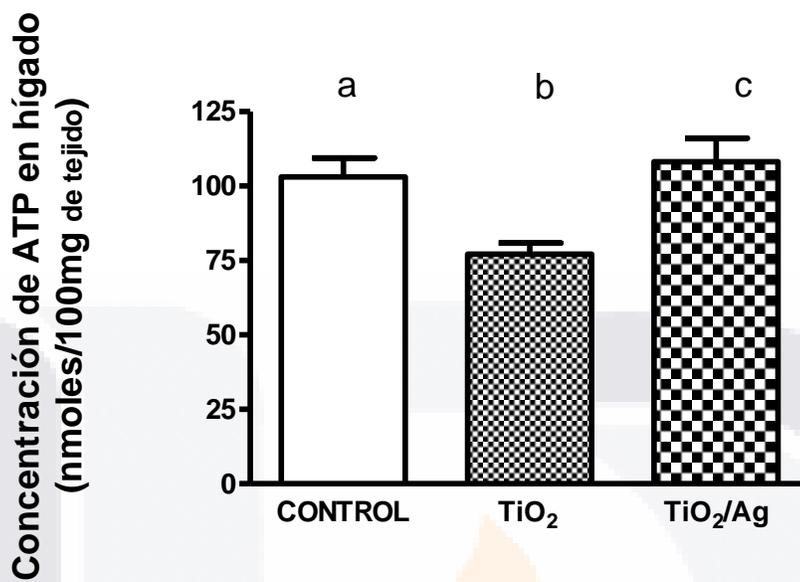


Figura VII.15.1. Concentración de ATP en hígado de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/kg, iv a los 28 días). Se expresan los valores medios ( $\pm$ eem), (a-b P<0.05, b-c P<0.05).

**VII. 16. Concentración de trifosfato de adenosina (ATP) en riñón (nm/100mg de tejido).**

La concentración de ATP en riñón a los 28 días de tratamiento en los grupos tratados con TiO<sub>2</sub> y con TiO<sub>2</sub>/Ag, no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control, aunque se tuvo una ligera tendencia a la disminución de dicho parámetro.

**Tabla VII.16.** Efecto de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub>/Ag (5mg/Kg, i.v.) sobre la concentración de ATP en riñón de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se expresan los valores medios (± e.e.m).

<b>Concentración de ATP en riñón (nm/100mg de tejido)</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Día 28</b>
Control negativo (n = 9)	89.29 ± 4.34
Tratamiento con TiO <sub>2</sub> (n = 6)	73.26 ± 9.47
Tratamiento con TiO <sub>2</sub> /Ag (n = 9)	85.87 ± 4.87

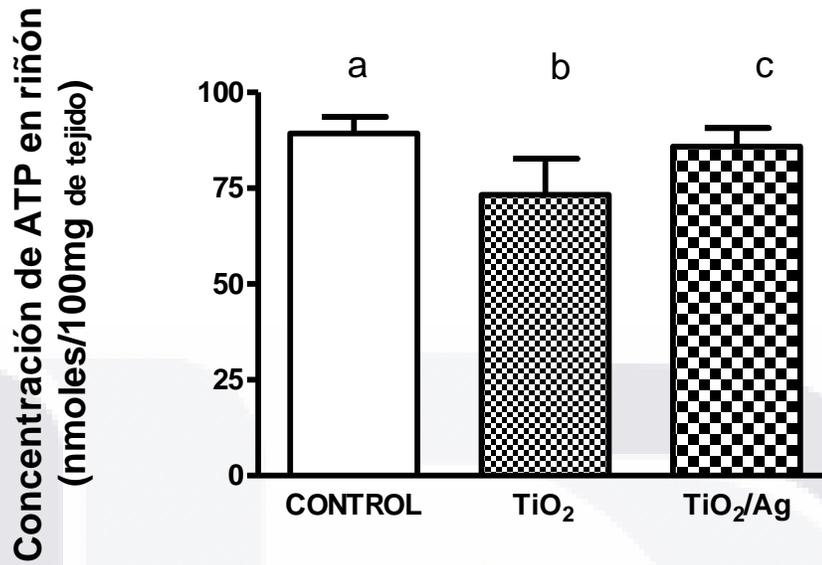
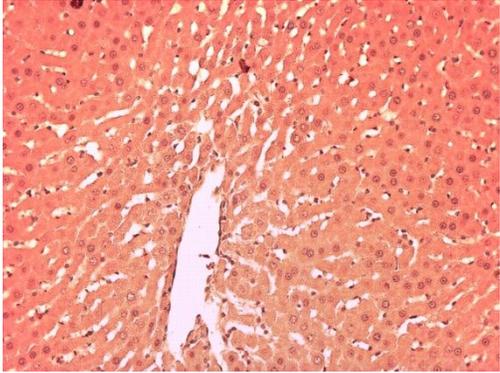
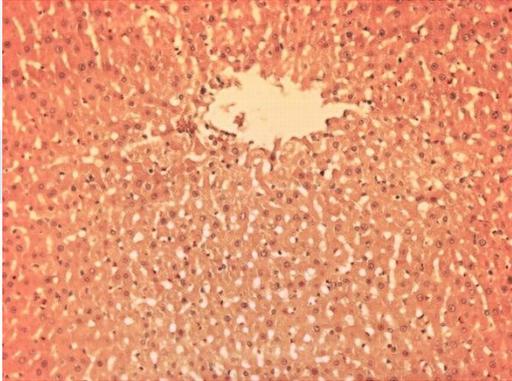
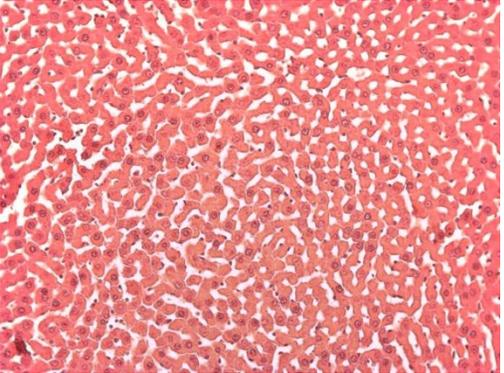


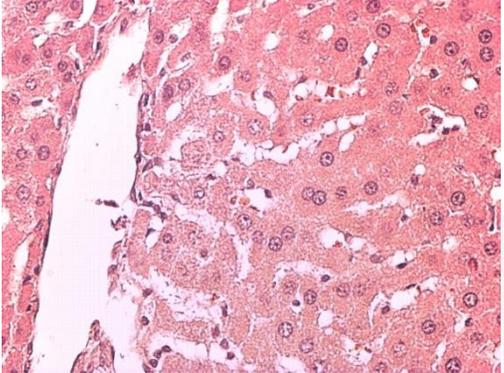
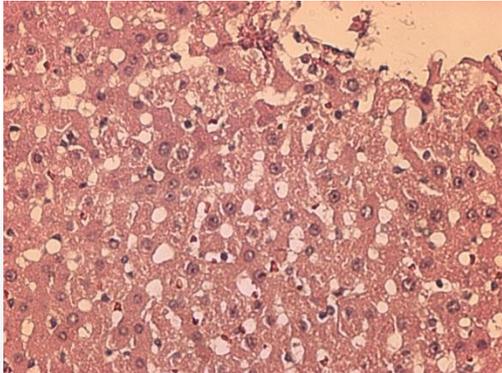
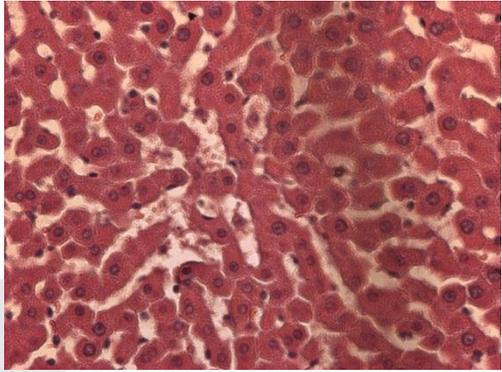
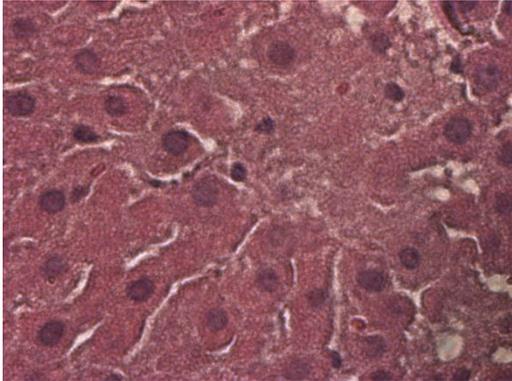
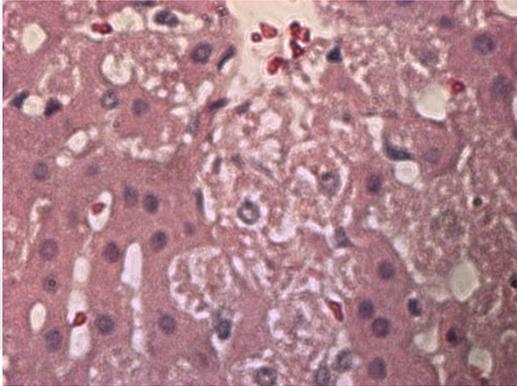
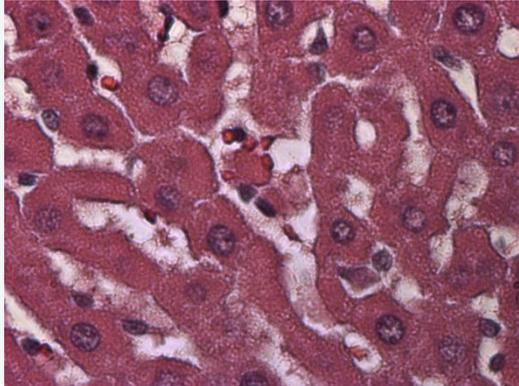
Figura VII.16.1. Concentración de ATP en riñón de ratas Wistar machos tratadas con TiO<sub>2</sub> (5mg/kg, iv a los 28 días) o con TiO<sub>2</sub>/Ag(5mg/kg, iv a los 28 días). Se expresan los valores medios ( $\pm$ sem).

**VII. 17. Estudio histológico de hígado.**

El estudio de tejido en hígado para el grupo control mostró una organización de hepatocitos normal, con algunos pocos vacuolizados. Ahora bien, para el tratamiento con  $TiO_2$ , Se presenta una mayor vacuolización, edema, lisis celular (células necróticas), pérdida de organización en el área centrolobulillar del tejido hepático. Por último, para el tratamiento con  $TiO_2Ag$ , también se observó vacuolización, pequeñas zonas con células necróticas en la zona centrolobulillar, sin embargo este efecto fue menor que con el tratamiento con  $TiO_2$ .

**Tabla VII.17.** Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la arquitectura tisular de hígado de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se obtuvieron las fotografías en aumentos de 10x, 20x y 40x.

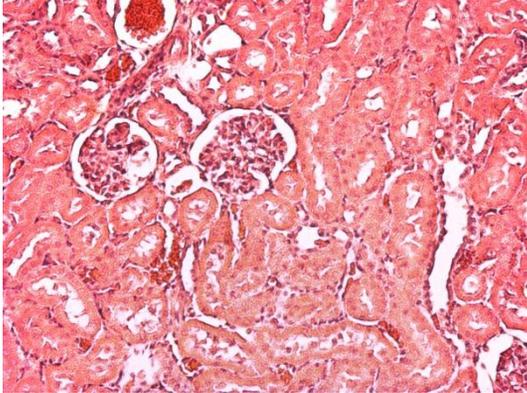
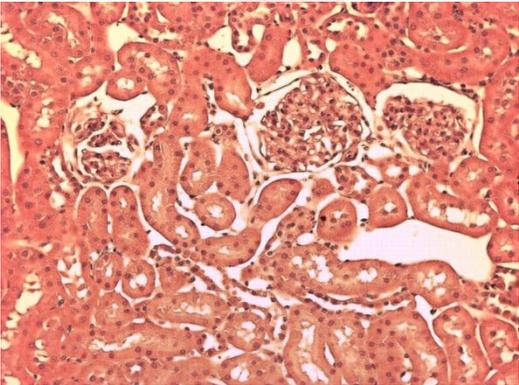
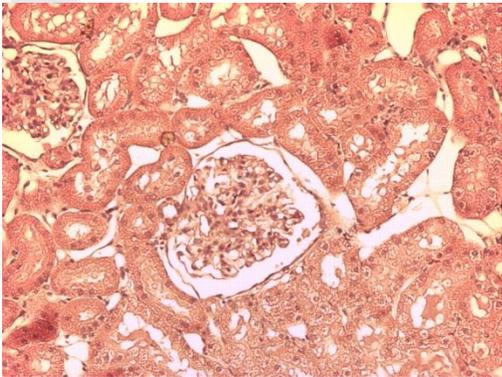
Grupo control	Tratamiento con $TiO_2$	Tratamiento con $TiO_2Ag$
10x	10x	10x
		

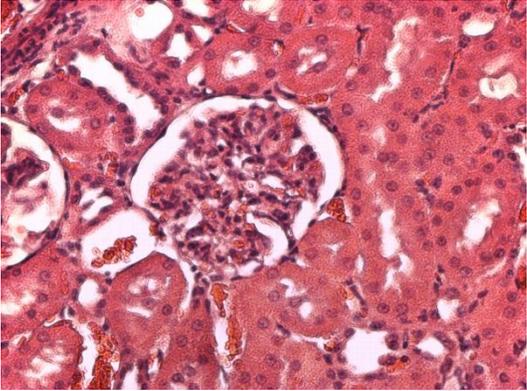
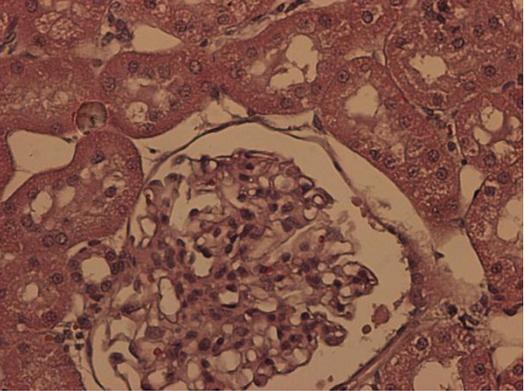
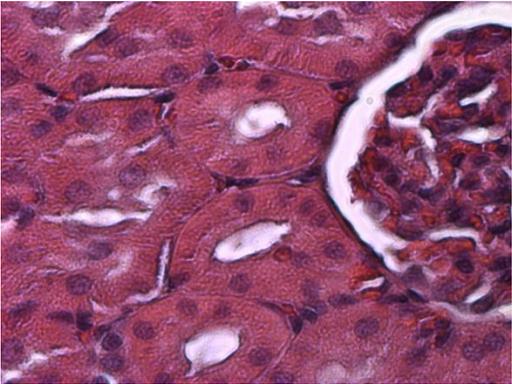
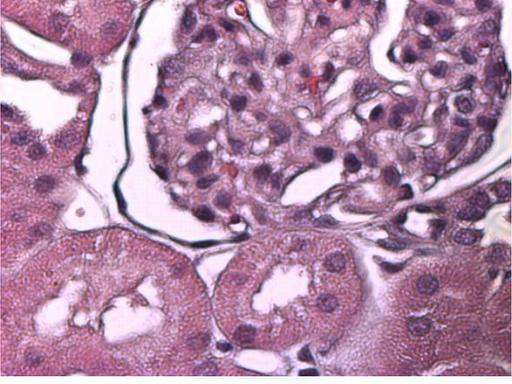
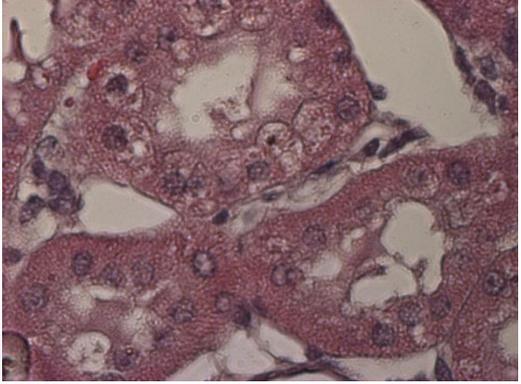
20x	20x	20x
		
40x	40x	40x
		

**VII. 18. Estudio histológico de riñón**

El estudio de tejido en riñón para el grupo control, mostró una estructura y organización de células normal. Para el caso del tratamiento con  $TiO_2$ , el resultado fue muy similar al del grupo control, ya que se observó una estructura tisular normal. Por último, para el tratamiento con  $TiO_2Ag$ , se observó edema celular con aumento de volumen en las nefronas yuxtamedulares y en los túbulos proximales.

**Tabla VII.18.** Efecto de nanopartículas de  $TiO_2$  y  $TiO_2/Ag$  (5mg/Kg, i.v.) sobre la arquitectura tisular de riñón de ratas Wistar machos a los 28 días de tratamiento. Se obtuvieron las fotografías en aumentos de 10x, 20x y 40x.

Grupo control	Tratamiento con $TiO_2$	Tratamiento con $TiO_2Ag$
10x	10x	10x
		

20x	20x	20x
		
40x	40x	40x
		

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El hígado y los riñones participan de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal y en la eliminación de xenobióticos. Sin embargo, estos órganos pueden ser dañados por muchas sustancias tóxicas, entre ellos los metales y sus nanopartículas (Klaassen y Watkins, 2001; Xia et al, 2006; Stone et al, 2007).

### VIII.1. Daño hepático.

Muchas sustancias pueden dañar al hígado a través de diversos mecanismos que incluyen la participación del estrés oxidativo. El daño celular puede iniciar por acciones nocivas como la inhibición de enzimas, la disminución en la concentración de antioxidantes, la disminución de las reservas de energía (ATP), la interacción de sustancia bioactivas con receptores y la alteración de la estructura de las membranas de las células.

En este trabajo, la concentración de albúmina en sangre disminuyó en los grupos tratados con nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  durante el 1° y 14° día de tratamiento, lo que indica la presencia de daño hepático. Sin embargo este parámetro aumentó significativamente al día 28° en los grupos tratados con respecto al grupo control. Debe señalarse que en estados de deshidratación, la hemoconcentración puede explicar este fenómeno. Además, la albúmina es una de las principales proteínas del plasma y constituye más del 50% del total de las proteínas séricas. Esta proteína mantiene la presión oncótica en los vasos sanguíneos (evitando con ello la fuga del agua plasmática desde los capilares) y transporta en la sangre a las sustancias insolubles en agua. El hígado sintetiza la albúmina y, por ello, su cuantificación en la sangre contribuye a la identificación de hepatopatías (Fischbach, 1997).

Asimismo, con relación al grupo control, la actividad sérica de la ALT de los animales tratados con  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  no se modificó de manera significativa, a los 28 días de tratamiento. En cuanto a la actividad plasmática de la enzima AST, no hubo cambios en los animales tratados con  $\text{TiO}_2$ , sin embargo, a los 28 días se presentó un aumento significativo en las ratas tratadas con  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ , con respecto al grupo control. Esto sugiere

que las nanopartículas de  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  tienen mayor toxicidad sobre las células hepáticas que las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ .

En este contexto, la ALT es una enzima que cataliza la transferencia reversible de un grupo amino en el ciclo Krebs y se encuentra fundamentalmente en los hepatocitos. Cuando hay daño hepático, el hepatocito se destruye y la enzima pasa del citoplasma al torrente sanguíneo, aumentando anormalmente sus valores en este fluido. Por ello, la determinación de la actividad sérica de esta enzima permite detectar daño agudo del hígado, lo que es útil para evaluar la toxicidad de xenobióticos sobre este órgano, entre otros padecimientos. A su vez, la AST cataliza la conversión de la fracción nitrogenada de un aminoácido en residuo de aminoácidos y se localiza en el citoplasma de muchas células, particularmente del hígado. Al igual que la ALT, pasa al plasma sanguíneo en cantidades proporcionales a la lesión celular. La determinación de esta enzima facilita la identificación de hepatopatías agudas y de otros padecimientos. Cabe señalar que, en lo que respecta al daño hepático, los incrementos de esta enzima son menores y de menor persistencia que los de la ALT (Hamilton y Rose, 1985).

Ahora bien, con relación al grupo control, el incremento significativo de la concentración de malondialdehído (MDA) en la sangre de las ratas expuestas al  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ , a los 14 y 28 días de tratamiento, indica la presencia aumentada de estrés oxidativo celular en estos animales. El estrés oxidativo puede ser producido por especies reactivas de oxígeno (ERO) como el radical hidroxilo, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. Estas especies son altamente reactivas y pueden lesionar estructuras o moléculas celulares como la oxidación de lípidos de las membranas, de proteínas y del ADN; además, se sabe que durante el proceso inflamatorio, los macrófagos liberan al radical superóxido (Kehrer J, 1993; Matés JM, 2000).

En efecto, el daño producido por las ERO sobre las membranas de las células es conocido como lipoperoxidación. Durante este proceso, la degradación de los ácidos grasos no saturados genera malondialdehído (MDA), una sustancia utilizada como biomarcador del estrés oxidativo celular. Debe señalarse que la lipoperoxidación aumenta la rigidez de la membrana y disminuye la presencia de enzimas y receptores en esta estructura celular (Kehrer J, 1993).

Las concentraciones de glutatión reducido (GSH) en el hígado fueron similares entre el grupo control y los animales tratados con  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ . Al respecto, debe señalarse que el hígado es un órgano que cuenta con reservas elevadas de GSH y, debido a su gran capacidad de síntesis de este compuesto, las dosis únicas administradas de los nanomateriales no alteraron su concentración tisular.

A los 28 días del tratamiento, la concentración hepática de ATP disminuyó de manera significativa en las ratas tratadas con  $\text{TiO}_2$ , con relación al grupo control y a los animales tratados con  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ . Este fenómeno puede estar relacionado con daño oxidativo sobre las mitocondrias. Conviene señalar que el ATP es un compuesto que almacena y proporciona energía química para un gran número de reacciones celulares, por ello, su determinación permite valorar la capacidad energética de las células (Tavazzi et al, 2000).

Por otra parte, las concentraciones de MDA en el hígado no mostraron variaciones importantes entre los animales de los grupos estudiados. En este contexto, el daño por lipoperoxidación en las células hepáticas medido con este marcador no es manifiesto, lo cual se relaciona con las concentraciones normales de GSH encontradas en dicho órgano. Esto puede estar ejerciendo un efecto protector contra la lipoperoxidación producida por el ataque de las ERO sobre los lípidos de las membranas plasmáticas de las células hepáticas.

Finalmente, respecto al grupo control, el estudio histológico del hígado mostró que en los grupos tratados con nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  se presentaron: células necróticas, pérdida de organización tisular y vacuolización sobre todo en el área centrolobulillar del acino hepático. Esto sugiere que a nivel tisular, las nanopartículas ejercieron un efecto tóxico al provocar la actividad de neutrófilos y macrófagos que promueven la producción de ERO con la aparición de estrés oxidativo. Esto daña a las estructuras celulares y desencadena los eventos mencionados anteriormente. Debe señalarse que el área centrolobulillar es la de mayor actividad metabólica, lo cual se relaciona con un mayor daño que en otras áreas del tejido hepático.

Con relación a los resultados obtenidos en nuestro estudio, se ha reportado la acumulación de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  en el hígado y apoptosis de hepatocitos de ratones, al ser tratados con esta sustancia a dosis de 50-150 mg/kg, por vía intraperitoneal (Linglan et al, 2009). Además, Fabian y colaboradores (2008) encontraron cambios en la actividad de enzimas hepáticas producidos por nanopartículas  $\text{TiO}_2$ , utilizando dosis de 5 mg/kg al 1°, 14° y 28° días de tratamiento, lo que es indicativo de daño tóxico. Por otra parte, se ha reportado un decremento en la viabilidad de células hepáticas cuando son expuestas a concentraciones mayores de 250  $\mu\text{g/ml}$  de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  (Hussein, et al., 2005).

Asimismo, ha sido encontrado que las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  al ser administradas por vía intragástrica se acumulan en el hígado, causan daño tisular y apoptosis de hepatocitos debido a que se estimulan vías de señalización acompañadas con la sobreproducción de citocinas, como  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  y  $\text{TNF-}\alpha$ , lo que desencadenan una respuesta inflamatoria (Cui Y, et al., 2010). Además, (Ma L et al, 2007), reportan que luego de la administración intraperitoneal de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  en ratones, se presenta su acumulación en el DNA de las células hepáticas, alterando el RNAm y la expresión de citocinas relacionadas con el proceso inflamatorio como el  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , factor inhibitorio de migración de macrófagos, IL-6, IL-4 e IL-10. Esto indica daño en el hígado por la producción de una respuesta inflamatoria, lo que a su vez conlleva a la generación de estrés oxidativo que daña estructuras celulares.

## **VIII.2. Daño renal.**

Muchos xenobióticos pueden afectar la estructura y/o la función de las células renales. Este daño es un fenómeno complejo que puede ser atribuido a diferentes causas, entre ellas: las diferencias del flujo sanguíneo regional, el transporte y acumulación de fármacos en las células, la reactividad de los blancos celulares (receptores), el equilibrio de reacciones de bioactivación-destoxicación, el metabolismo energético y la eficacia de los mecanismos de regeneración y reparación celular. Además, diversas sustancias pueden inducir estrés oxidativo al aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Estos radicales libres reaccionan con diversos componentes de las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

células induciendo daño tóxico por mecanismos como: 1) peroxidación de lípidos, fenómeno que modifica la fluidez, la permeabilidad y el transporte de la membrana, 2) inactivación de enzimas por oxidación de grupos sulfhidrilo o amino de estas proteínas, 3) despolimerización de polisacáridos y 4) rotura de cromosomas y filamentos de ADN. Cada uno de estos fenómenos puede producir lesión o muerte celular (Jaramillo et al, Tox Básica).

Al respecto, los túbulos proximales son el sitio dañado con más frecuencia por los xenobióticos. Esto se debe en parte a la acumulación de las sustancias químicas en este segmento de la nefrona. En efecto, la reabsorción de fármacos y la secreción de aniones y cationes orgánicos permiten que aumente su concentración en las células proximales. Además, la bioactivación de sustancias por el CYP450 se realiza principalmente en este segmento de la nefrona. La reactividad de los xenobióticos con los blancos subcelulares o moleculares y el tiempo de exposición a los mismos determinan su toxicidad. Por ello, los riñones pueden ser dañados de manera aguda o crónica por muchas sustancias que actúan de diferente manera.

En nuestro estudio, los valores de creatinina en sangre presentaron variaciones leves que están dentro del rango normal para este parámetro. Por ello, la filtración glomerular no fue afectada por las nanopartículas. Conviene señalar que la creatinina es el principal metabolito de la creatina, es producida en cantidades proporcionales a la masa corporal total del cuerpo y es eliminada del plasma fundamentalmente por filtración glomerular para ser excretada en la orina. No hay una “recirculación” de la creatinina, razón por la cual la depuración de esta sustancia es relativamente grande y constante y, por esta causa, constituye un indicador eficaz de la función renal, específicamente, de la filtración glomerular (Fischbach, 1997).

Relacionado con lo anterior, el flujo urinario presentado por el grupo control y los grupos tratados con nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ , no tuvo variaciones importantes que pudieran sugerir daño de las nanopartículas sobre este parámetro fisiológico. Este fenómeno indica que el tratamiento empleado en los animales de experimentación no interfiere con la formación y eliminación de orina. En efecto, regulado por los riñones, el volumen de orina refleja la homeostasis global de líquidos en el organismo. Por ello, la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

determinación del flujo urinario aporta datos útiles respecto a la integridad y función de los riñones (Hamilton y Rose, 1985).

Sin embargo, la masa excretada de proteínas en la orina aumentó de manera significativa en los animales tratados con nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , respecto al grupo control, sin que se presentaran cambios importantes en las ratas tratadas con  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ . Esto sugiere que el  $\text{TiO}_2$  puede afectar a las células de los túbulos renales, disminuyendo la reabsorción de proteínas de bajo peso molecular como las globulinas. En efecto, debe señalarse que, en condiciones fisiológicas normales, la membrana de los capilares glomerulares impide la salida de compuestos de peso molecular elevado, como la albúmina, pero permite que se filtren proteínas de peso molecular bajo, como las microglobulinas, las cuales son reabsorbidas por los túbulos renales y solo se excreta una cantidad pequeña de ellas. La lesión de la membrana glomerular y/o el daño de la reabsorción tubular permiten la pérdida de proteínas en la orina. Por ello, su excreción urinaria ayuda a identificar lesiones en los glomérulos o en los túbulos renales proximales.

Ahora bien, a los 28 días del tratamiento, la masa excretada de  $\text{Na}^+$  aumentó en los animales expuestos a las nanopartículas, respecto al grupo control, siendo más claro y significativo este incremento en las ratas que recibieron  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ . Este resultado indica que el daño oxidativo que producen las nanopartículas antes mencionadas, dañan a las células del túbulo proximal encargadas de reabsorber al  $\text{Na}^+$  que se filtra en los glomérulos renales.

Debe señalarse que el manejo renal de agua y solutos filtrados en los glomérulos es un proceso complejo e integrado, durante el cual el volumen del filtrado glomerular y su composición se alteran de manera progresiva, mientras el líquido fluye por los diferentes segmentos tubulares. En el túbulo proximal es reabsorbido del 60 al 80 % del agua y solutos filtrados. La resorción de agua es un proceso pasivo e iso-osmótico impulsado de manera primaria por la resorción de los iones de  $\text{Na}^+$ . Estos iones difunden al interior de las células proximales y salen de ellas mediante la actividad de la  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ , localizada en la membrana basolateral. Además, en este sitio existen sistemas de transporte que secretan diversas sustancias endógenas y xenobióticos. Para que los procesos de reabsorción y secreción funcionen adecuadamente, se requiere de un

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

elevado aporte de energía y, por ello, las células proximales tienen abundantes mitocondrias. Esta circunstancia explica el hecho de que los xenobióticos que afectan la producción de energía, o cualquiera de los sistemas especializados de transporte, puedan dañar la función renal (Jaramillo et al, Tox Básica).

Ahora bien, la masa excretada de glucosa en la orina no presentó variaciones importantes, con respecto al grupo control. Al respecto, se requiere realizar más experimentos para definir con claridad el efecto de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  sobre este parámetro.

Sin embargo, las concentraciones renales de GSH disminuyeron de manera significativa en los animales tratados con  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ , respecto al grupo control, siendo aún más notorio en el tratamiento con  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ . Estos resultados pueden ser explicados por el consumo de GSH para neutralizar a las ERO producidas en exceso durante el estrés oxidativo renal. Por ello, la concentración renal de malondialdehído no presentó cambios significativos en los grupos tratados con  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ , respecto al grupo control, así como tampoco se modificó significativamente la concentración de ATP en los animales tratados con las nanopartículas estudiadas.

Finalmente, con relación al grupo control, la estructura y organización del tejido renal no se modificó en los animales tratados con  $\text{TiO}_2$ , aunque en las ratas tratadas con  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  se observó edema celular con aumento de volumen en las nefronas yuxtamedulares y en los túbulos proximales. Debe señalarse que el estudio estructural del tejido renal proporciona datos valiosos respecto a la función glomerular y tubular, así como en padecimientos que incluyen la glomerulonefritis aguda y crónica, la pielonefritis, la trombosis de la vena renal y la necrosis tubular aguda (Fischbach, 1997).

En este contexto, Xia y colaboradores (2006) señalan que a pesar de que no todos los nanomateriales tienen configuraciones electrónicas o propiedades de superficie requeridas para producir de manera espontánea ERO, las interacciones de estas partículas con las estructuras de las células son capaces de generar estrés oxidativo. Asimismo, en estudios toxicológicos realizados in vivo e in vitro se ha encontrado que la baja solubilidad de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  conduce a la generación de procesos

inflamatorios (Stone et al, 2007). Al respecto, en estudios in vitro realizados por Goncalves y colaboradores (2009) se demostró que las nanopartículas de  $TiO_2$  provocan la activación de neutrófilos y la sobreproducción de quimiocinas y citocinas como la IL-8.

Ahora bien, al evaluarse recientemente la toxicidad de nanopartículas de  $TiO_2$  en cultivos de células renales de humanos (HEK-293) se encontró lo siguiente: a) inducción significativa de citotoxicidad celular de manera dosis-dependiente y tiempo-dependiente, b) presencia de estrés oxidativo y apoptosis, así como, c) identificación de la expresión de p53, Bax y caspasa-3 de manera dependiente de la dosis. Se concluyó que el estrés oxidativo mediado por las ERO, la activación de p53, Bax y caspasa-3, así como el daño al DNA, se relacionan con los mecanismos de toxicidad de las nanopartículas de  $TiO_2$  que conducen a la apoptosis de las células renales HEK-293 (Meena et al, 2012). Sin embargo, debe señalarse que también ha sido reportada la ausencia de daño oxidativo producida por nanopartículas de  $TiO_2$  en cultivos de células renales del mesangio y del túbulo proximal (Pujalté, et al., 2011).

Por todo lo anteriormente expuesto, la administración de nanopartículas de  $TiO_2$  o  $TiO_2/Ag$  a los humanos debe ser realizada de manera responsable y controlada, ya que se debe considerar que no son totalmente inocuos, como se muestra en el presente estudio y en otros que han sido publicados.

## IX. CONCLUSIONES

- I. El incremento de la concentración de malondialdehído (MDA) en la sangre de las ratas expuestas al  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ , a los 14 y 28 días de tratamiento, indica la presencia aumentada de estrés oxidativo celular en estos animales.
- II. Las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  o  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  dañan al hígado: a) disminuyendo la producción de albúmina, b) elevando la actividad sérica de AST (particularmente  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ ), c) disminuyendo la concentración hepática de ATP (ratas tratadas con  $\text{TiO}_2$ ) y d) produciendo daño estructural caracterizado por la presencia de células necróticas, pérdida de organización tisular y vacuolización sobre todo en el área centrolobulillar del acino hepático.
- III. Las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  o  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  dañan a los riñones: a) aumentando la masa excretada de proteínas en la orina ( $\text{TiO}_2$ ), b) aumentando la masa excretada de  $\text{Na}^+$  (particularmente con  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ ), c) disminuyendo las concentraciones renales de GSH y d) produciendo daño estructural caracterizado por edema celular con aumento de volumen de las nefronas yuxtamedulares y de los túbulos proximales ( $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ ).

## X. GLOSARIO

### A

**Apoptosis.** Proceso fisiológico previsto de muerte y desintegración de tejidos dentro del desarrollo normal de los seres vivos. *Termino relacionado:* necrosis. Una cascada de enzimas proteolíticas que resulta en muerte celular controlada en respuesta al daño celular importante o programas específicos de desarrollo. También llamada muerte celular programada.

**Ateroesclerosis.** Trastorno común que ocurre cuando se acumulan grasa, colesterol y otras sustancias en las paredes de las arterias y forman estructuras duras llamadas placas.

**Alopurinol.** Medicamento utilizado como tratamiento de la gota y los altos niveles de ácido úrico en el cuerpo causado por ciertos medicamentos para tratar el cáncer y los cálculos renales.

**Amiloide.** Nombre genérico para designar diversas sustancias que tienen en común estar constituidas por proteína fibrilar b-plegada. Este tipo de estructura no ocurre normalmente en las proteínas de los mamíferos.

**ATP.** Adenosín trifosfato, nucleótido que constituye la fuente de energía para la mayoría de reacciones químicas que tienen lugar en las células vivas.

**Albumina.** Proteína que se encuentra abundantemente en la sangre del ser humano y es sintetizada en el hígado, representando el 54,31% de la proteína plasmática. Normalmente tiene una presencia en sangre humana de 3,5 a 5 gramos por decilitro. Su presencia elevada en la orina (síndrome nefrótico) indica enfermedades.

### B

**Bioluminiscencia.** Producción de luz por parte de un organismo vivo.

## C

**Cáncer.** Denominación de las tumoraciones malignas. Los carcinomas se originan en las células epiteliales; los sarcomas en el tejido conjuntivo. Más estricto: carcinoma, epitelioma, sarcoma. *Término relacionado:* carcinógeno, carcinogénesis, carcinogenicidad, neoplasia, tumor. Un crecimiento descontrolado de células anormales, creando un tumor que puede invadir los tejidos que lo rodean y puede dispersarse (metástasis) a órganos distantes.

**Colédoco.** Conducto formado por la unión de los conductos cístico y hepático; desemboca en el duodeno.

**Carcinogénesis.** Proceso de inducción de neoplasias malignas por agentes físicos, químicos o biológicos. *Término relacionado:* Carcinógeno, cancerígeno.

**Cardiomiopatías.** Grupo de enfermedades en el que la característica dominante es la implicación del propio Músculo cardíaco. Las cardiomiopatías se clasifican de acuerdo a sus características fisiopatológicas predominantes (cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía restrictiva) o sus factores etiológicos/patológicos (cardiomiopatía alcohólica, fibroelastosis endocárdica).

**Células T.** Célula inmunitaria que reconoce y destruye células extrañas, células infectadas por virus y también células cancerosas.

**Citocinas.** Sustancia elaborada por las células del sistema inmunitario. Algunas citocinas pueden estimular la respuesta inmunitaria y otras pueden suprimirla. Las citocinas también se pueden producir en el laboratorio por medio de la tecnología del ADN recombinante y usarse para tratar distintas enfermedades, incluso el cáncer.

**CYP2E1.** citocromo P450 2E1, es miembro del sistema oxidasa de función mixta citocromo P450, que participa en el metabolismo de xenobióticos en el cuerpo. Aunque está solo involucrado enzimáticamente en el metabolismo oxidativo de un pequeño rango de sustratos (la mayoría moléculas polares pequeñas), se sabe que existen muchas interacciones medicamentosas importantes mediadas por el CYP2E1.

**Citotoxicidad.** La citotoxicidad es la cualidad de ser tóxico a células. Ejemplos de agentes tóxicos son una sustancia química o una célula inmune.

**Creatinina.** Compuesto que el cuerpo elimina en la orina. Las concentraciones de creatinina se miden para vigilar el funcionamiento de los riñones.

## D

**Duodeno.** Parte inicial del intestino delgado de los mamíferos situada entre el final del estómago y el yeyuno, donde van a parar los jugos digestivos del hígado y del páncreas.

**Dermis.** Capa más gruesa de la piel de los vertebrados que se encuentra debajo de la epidermis.

## E

**Endotelio vascular.** Tejido, formado por una sola capa de células, que tapiza las paredes internas del corazón, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos.

**ERO.** Especies reactivas de oxígeno. Pueden generar un estado de estrés oxidativo.

**Estrés oxidativo.** Estado del organismo causado por un exceso de concentración de radicales libres en el cuerpo. El daño oxidativo contribuye a la aparición y aceleración de enfermedades específicas (alzheimer, cáncer, parkinson, diabetes y enfermedades cardiovasculares, entre otras) y al deterioro progresivo de las funciones vitales.

**ERN.** Especies reactivas de nitrógeno. Pueden generar un estado de estrés oxidativo.

**Electrolito.** Sustancia que, fundida o en disolución acuosa, se disocia en iones, por lo cual es conductora de la electricidad: son electrolitos los compuestos iónicos como las sales, el cloruro de sodio y los ácidos.

**Estrato córneo.** La capa callosa más externa de la piel, formada por células muertas convertidas en queratina que se descaman continuamente. El estrato córneo es grueso en las palmas de las manos y las plantas de los pies y más delgado en las áreas más protegidas.

**Espectrofotometría.** Método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y bioquímicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

**Edema.** Acumulación excesiva de líquido en algún órgano o tejido del cuerpo.

## F

**Fármaco.** Cualquier producto que puede ser absorbido por un organismo, difundirse en él y producirle cambios, favorables o no. Los fármacos empleados para el tratamiento de enfermedades son los medicamentos.

**Fibrosis hepática.** múltiples eventos celulares y moleculares que inducen un excesivo depósito de proteínas de matriz extracelular que distorsionan la arquitectura del parénquima hepático, cuya etapa final es conocida como cirrosis.

**Fosforilación oxidativa.** El proceso en el cual el ATP es formado como un resultado de la transferencia de electrones desde NADH o FADH<sub>2</sub> a O<sub>2</sub> por una serie de transportadores de electrones.

**Farmacocinética.** Proceso de captación de fármacos por el cuerpo, biotransformaciones que sufre, distribución de la sustancia y de sus metabolitos en los tejidos, u eliminación de los mismos. Se estudian tanto las cantidades como las concentraciones de las sustancias y de sus metabolitos. El término tiene en esencia el mismo sentido que toxicocinética, pero este último hace referencia al estudio de cualquier tipo de sustancia tóxica. *Sinón.* parcial toxicocinética. *Término relacionado:* biotransformación.

**Fluorescencia.** Propiedad de algunas sustancias por la cual, al ser expuestas a la acción de ciertos rayos, transforman estas radiaciones, emitiendo ondas luminosas de longitud de onda mayor que la de los rayos incidentes.

## G

**GSH.** Glutatión. El tripéptido glutamil-cisteinil-glicina. Se encuentra en la mayoría de los tejidos, sobre todo en el hígado. Juega un papel importante en la detoxificación y protección celular.

**Glomérulo.** Red de finos capilares en forma de ovillo rodeados por la cápsula de Bowman que forma parte de la nefrona (unidad funcional del riñón). La sangre fluye por los capilares sanguíneos y se produce la filtración de los productos de desecho (urea, ácido úrico, sales minerales y agua).

## H

**Homeostasis.** Estado de equilibrio entre todos los sistemas del cuerpo que el cuerpo necesita para sobrevivir y funcionar correctamente. En la homeostasis, las concentraciones de ácido en el cuerpo, la presión arterial, el azúcar en la sangre, los electrolitos, la energía, las hormonas, el oxígeno, las proteínas y la temperatura se ajustan constantemente para responder a los cambios en el interior y el exterior del cuerpo. De esa manera, todos los sistemas se mantienen en un nivel normal.

**Hepatotoxicidad.** También llamada enfermedad hepática tóxica inducida por drogas implica daño sea funcional o anatómico del hígado inducido por ingestión de compuestos químicos u orgánicos. El hígado está especialmente expuesto a toxicidad por razón de su función en la biotransformación, metabolismo y eliminación de agentes potencialmente tóxicos.

**HNE.** 4-Hidroxi-nonenal. Producto de la oxidación de lípidos de membrana en células de un organismo..

I

**IL-8.** Interleucina 8. Citocina producida por diversos tipos de células implicadas en la inflamación, que atrae y activa los neutrófilos.

**IL-12.** Interleucina 12. Factor proteico que actúa sobre células T como un factor de maduración de linfocitos citotóxicos. Su fuente son células T activadas, y su función es estimular la muerte activada por células mediante células asesinas naturales y linfocitos.

**Isquemia.** Deficiencia local de aporte de sangre y, por lo tanto, de oxígeno a un órgano o tejido, a causa de obstrucción o constricción de algún vaso sanguíneo.

**Insuficiencia renal.** Afección en la cual los riñones dejan de funcionar y no pueden eliminar los desperdicios y el agua adicional de la sangre, o mantener en equilibrio las sustancias químicas del cuerpo. La insuficiencia renal aguda o grave se presenta repentinamente (por ejemplo, después de una lesión), y puede tratarse y curarse. La insuficiencia renal crónica evoluciona en el curso de muchos años, puede ser provocada por afecciones como la presión arterial alta o la diabetes, y no se puede curar. La insuficiencia renal crónica puede llevar a una insuficiencia renal total y duradera que se llama enfermedad renal en estado terminal (ERET). El individuo que padece de ERET necesita diálisis (el proceso de limpiar la sangre haciéndola pasar por una membrana o filtro) o un trasplante de riñón. También se llama insuficiencia del riñón.

J

K

**Kupffer, células.** Células fagocitarias hepáticas pertenecientes al sistema reticulohistiocitario que bordean los sinusoides hepáticos, sin constituir en realidad una pared. Entre ellas y las células hepáticas se hallaría el espacio de Disse, espacio virtual, que corresponde al inicio de los linfáticos hepáticos. Contribuyen a la formación de bilirrubina a partir de los glóbulos rojos destruidos

L

**Lipoperoxidación.** Oxidación de los lípidos de las membranas en células del organismo producido por un estado de estrés oxidativo.

**Lisis celular.** Destrucción de una célula por rotura de la membrana celular.

M

**Microglia, células.** Células pequeñas con núcleo alargado y con prolongaciones cortas e irregulares que tienen capacidad fagocitaria, que forman parte del conjunto de células neurogliales del tejido nervioso.

**Miocitos.** Células musculares

**Macrófago.** Tipo de glóbulo blanco que rodea los microorganismos y los destruye, extrae las células muertas y estimula la acción de otras células del sistema inmunitario.

**MDA.** Malondialdehído. Subproducto derivado del metabolismo de los lípidos (grasas) en el cuerpo. Indicador de oxidación de lípidos en membranas celulares. Se encuentra en muchos alimentos y puede estar presente en grandes cantidades en la comida rancia.

**Mutagénesis.** Introducción de cambios heredables (mutaciones) del genotipo en una célula como consecuencia de alteración o de pérdida de genes o de cromosomas (o de parte ellos).

**Monooxigenasas, enzima.** Enzimas que usan el O<sub>2</sub> e incorporan un átomo de oxígeno dentro de un sustrato y reducen el otro átomo a agua; importante en la síntesis de hormonas esteroideas y tirosina, también como en la detoxificación de compuestos xenobióticos.

## N

**Nanotecnología.** Campo de investigación que trata con la ingeniería y la creación de cosas hechas con materiales que tienen un tamaño de menos de 100 nanómetros (una billionésima de metro); en particular, átomos simples o moléculas. La nanotecnología está en estudio para la detección, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

**Nanometro.** Medida de longitud que equivale a la milmillonésima parte de un metro.

**Nanomaterial.** Son materiales a nanoescala. Materiales con características estructurales de una dimensión entre 1-100 nanómetros.

**Nanopartícula.** Partícula que es más pequeña que 100 nanómetros (milmillonésima parte de un metro). En el campo de la medicina, se pueden usar nanopartículas para transportar anticuerpos, medicamentos, elementos para las pruebas con imágenes y otras sustancias hasta ciertas partes del cuerpo. Las nanopartículas están en estudio para la detección, el diagnóstico y el tratamiento de cáncer.

**Neoplasia.** Formación nueva y anormal del tejido tumoral, o crecimiento por proliferación celular más rápida de lo normal y que continúa después de haber cesado el estímulo inicial que lo desencadenó. *Sinón. parcial:* tumor. *Término relacionado:* hiperplasia, metaplasia.

**Necrosis.** Muerte masiva de áreas de tejido rodeadas de zonas sanas. Cambios morfológicos subsiguientes a la muerte celular, caracterizados frecuentemente por cambios nucleares.

**Neutrófilos.** Tipo de célula inmunitaria; es uno de los primeros tipos de células que van al sitio de una infección. Los neutrófilos ayudan a combatir infecciones porque ingieren los microorganismos y segregan enzimas que los destruyen. Un neutrófilo es un tipo de glóbulo blanco, un tipo de granulocito y un tipo de fagocito.

**Nanofármaco.** Fármaco producido mediante nanotecnología.

## O

**Oncogén.** Gen que puede causar transformación neoplásica de las células: los oncogenes son genes con ligeros cambios respecto a genes normales llamados proto-oncogenes.

**Oxidación.** Reacción química en la que una sustancia se combina con oxígeno. Químicamente se corresponde con un aumento de cargas positivas del átomo debido a una pérdida de electrones.

## P

**Peroxisoma.** Orgánulos parecidos a los lisosomas pero de menor tamaño, que contienen enzimas oxidantes como las catalasas. La función de los peroxisomas, muy abundantes en las células hepáticas, es la detoxificación de sustancias potencialmente tóxicas. Recientemente se ha descubierto que estén implicados en la lipogénesis.

**Péptido.** Molécula que contiene dos o más aminoácidos (las moléculas que se unen entre sí para formar proteínas). Los péptidos pueden contener muchos aminoácidos que se llaman polipéptidos o proteínas.

**Parénquima.** Tejido conjuntivo esencial de ciertos órganos glandulares: parénquima hepático.

## Q

**Quimiocinas.** Proteínas de pequeño tamaño pertenecientes a una familia de las citoquinas.

## R

**RL.** Radical libre. Tipo de molécula inestable que se elabora durante el metabolismo normal de las células (cambios químicos que ocurren en una célula). Los radicales libres se pueden acumular en las células y dañar otras moléculas, como el ADN, los lípidos y las proteínas. Este daño puede aumentar el riesgo de cáncer y otras enfermedades.

**Reducción.** Reacción química en la que una sustancia (oxidante) se reduce al combinarse con otra (reductor), de tal forma que gana electrones y disminuye su número de oxidación: siempre que se produce una reducción, se produce la oxidación de otra sustancia.

## S

**Sarcoma.** Tumor maligno que crece en el tejido conectivo y compuesto primariamente de células anaplásicas que simulan tejido de sostén.

**SNC.** Sistema Nervioso Central. Constituido por el encéfalo y la médula espinal.

**Sustancia negra.** Núcleo en la base del mesencéfalo que recibe aferencias desde algunas estructuras corticales y subcorticales. También se conoce como locus niger o locus de Sömmering.

## T

**Tubulina.** Proteína de un grupo que se encuentra en concentraciones altas en el citoplasma de las células (líquido adentro de la célula, pero afuera de su núcleo). Las tubulinas son los elementos fundamentales de los microtúbulos (tubos estrechos y huecos del interior de una célula), que participan en la multiplicación y el movimiento de las células. Ciertos medicamentos anticancerosos se unen a las tubulinas y bloquean su formación o su funcionamiento, con lo que pueden bloquear la multiplicación de las células.

**Telómero.** Extremos de un cromosoma. Cada vez que la célula se divide, los telómeros pierden una pequeña cantidad de ADN y se acortan. Con el transcurso del tiempo, los cromosomas se dañan y las células mueren. En las células cancerosas, los telómeros no se acortan y se pueden alargar a medida que las células se dividen.

**Túbulo proximal, riñón.** Parte de la nefrona que realiza funciones de secreción y reabsorción de sustancias importantes en el organismo.

**TNF- $\alpha$ .** Factor de necrosis tumoral alfa. Proteína del grupo de las citocinas liberadas por las células del sistema inmunitario que interviene en la inflamación y la destrucción articular secundarias a la artritis reumatoide, así como en otras patologías.

**TNF- $\beta$ .** Factor de necrosis tumoral beta. Proteína de 25 kD sintetizada por linfocitos activados, también denominada linfotoxina. Posee actividad citotóxica contra células tumorales en cultivo, estimula la proliferación de fibroblastos y ejerce acciones muy similares a las del factor de necrosis tumoral alfa. Participa en la inflamación y en el rechazo de órganos y probablemente en la patogenia del SIDA.

**TiO<sub>2</sub>.** Dióxido de titanio. Compuesto utilizado como vehículo de fármacos contra enfermedades como el cáncer en forma de nanopartícula. Utilizado principalmente como pigmento blanco diversas aplicaciones como cosméticos, pinturas, producción de hules cerámica, alimentos, bloqueadores solares debido a que refleja la radiación solar, así como en procesos de oxidación fotocatalizadora.

**TiO<sub>2</sub>/Ag.** Dióxido de titanio dopado con plata.

**Toxicidad.** Medica en que algo es venenoso o dañino.

**U**

**V**

**Vector.** Portador, que transfiere un agente de un huésped a otro. Sistema que permite la transferencia, la expresión y la replicación de un ADN extraño en células huésped para una posterior clonación o transgénesis.

**Vacuolización celular.** Proceso de formación de vacuolas que tiene lugar en los proceso de degeneración celular.

**W**

**Wistar, ratas.** Ratas albinas que pertenecen a la especie *Rattus norvegicus*. 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 *Mus musculus*, o el ratón común de las casas.

**X**

**Xenobiótico.** En sentido estricto, cualquier sustancia que interactúa con un organismo y que no es uno de sus componentes naturales. *Sinón.* Sustancia exógena, sustancia extraña.

Y

Z



## XI. BIBLIOGRAFÍA

Adams H: Adenosine-5-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase. In: Methods of enzymatic analysis (Bergmeyer Ed.), Academic Press, pp 539-543, 1963.

Armijo JA: Farmacocinética-Absorción, distribución y eliminación de los fármacos. En: Farmacología humana (Jesús Flórez, Edit.), Masson, 4a. Edición, pp 51-79, 2003.

Afaq F, Abidi P, Martin R, Rahman Q: Cytotoxicity, prooxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultra-fine titanium dioxide. J Appl Toxicol, 18: 307-312, 1998.

Bauer JB: Carbohydrates and nitrogen compounds. In: Clinical Laboratory Methods, Chap. 21, 9<sup>th</sup> Edition. CB Mosby Co, St.Louis, pp. 472-505, 1982.

Bauerova K., & Bezek S., Role of reactive oxygen species and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. Gen. Physiol. Biophys. 18: 15-20, 1999.

Bharali D. J., Khalil M., Gurbuz M., Simone T.M., Mousa S.A: Nanoparticles and cáncer therapy: A concise review with emphasis on dendrimers. International Journal of Nanomedicine 4: 1-7, 2009.

Becerra S.L., Rodríguez M.L., Jaramillo F., Martínez M.C., Rodríguez M.G., Reyes M.A., Posadas F.A: Nefrotoxicidad producida por el cromo y actividad urinaria de la dipeptidilaminopeptidasa IV en ratas. Efecto protector de la Quercetina. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 39: 5-11, 2008.

Bermudez E., Mangum J.B., Wong B.A., Asgharian B., Hext P.M., Warheit D.B., Everitt J.I., Pulmonary responses of mice, rats and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. Toxicol Sci. 77: 347-357, 2004.

Borm PJ, Kreyling W: Toxicological hazards of inhaled nanoparticles-potential implications for drug delivery. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 4: 521-531, 2004.

Cadenas E., & Davis K.J.A: Mitochondrial free radical generation oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 222-230, 2000.

Cohn VH, Lyle J: A fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem*, 14: 434-440, 1966.

Cheng J, Dong X, Zhao J, Tang G: In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *J Appl Toxicol*, 29(4): 330-337, 2009.

De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJAM, et al: Shedding light on tumors using nanoparticles. *Account of Chemical Research*, 41: 1721-1730, 2008.

De Jong WH, Borm PJ: Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*, 3(2): 133-149, 2008.

Dong Y, Bai Z, Liu R, wang X, Yan H, Zhu T: Heterogeneous decomposition of indoor ammonia in a photoreactor with TiO<sub>2</sub>-finished cotton fabrics. *Environ Technol*, 27(7): 705-714, 2006.

Doumas B et al: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromoresol green. *Clin Chim Acta*, 31: 87-96, 1971.

Elejalde J.I: Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An. Med. Interna (Madrid)*. 18: 326-335, 2001.

Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, Ravenzwaay B: Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch Toxicol*, 82: 151-157, 2008.

Ferin J., Oberdorster G., Penney D.P: Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 6: 535-542, 1992.

Fischbach T., Manual de Pruebas diagnósticas, McGraw-Hill-Interamericana, 5° edición, 1149 págs, 1997.

Glenn S II, Jay GA: General principles of toxicology. En Toxicology: The Basic Science of Poisons (Curtis & Doull Eds), MacMillan Publishing Company, NY, 1986.

González I, Marín C, Martín A, Nombela G: Nanopartículas-Aplicaciones y perspectivas que revolucionarán la farmacología. CNEM, 1: 1-7, 2009.

Goncalvez D.M., De Liz R., Girard The Inflammatory Process in Response to Nanoparticles. The Scientific World JOURNAL 11: 2441-2442, 2001.

Goncalves D.M., De Liz R., Girard D: Activation of Neutrophils by Nanoparticles. The Scientific World JOURNAL 11: 1877-1885, 2011.

Grassian VH, O'Shaughnessy PT, Adamcakova-Dodd A, Pettibone JM, Thorne PS: Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary size of 2 to 5 nm. Environ Health Perspect, 115 (3): 397-402, 2007.

Hamilton H.K., Rose M.B., Diagnóstico Clínico. Nueva Editorial Interamericana. México D.F. 1985.

Hamilton R.F., Wu N., Porter D., Buford M., Wolfarth M., Holian A: Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. Particle and Fibre Toxicology 6:35, 2009.

Hawkins MJ, Soon-Shiong P, Desai N: Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. Adv Drug Deliv Rev, 60(8): 876-885, 2008.

Hedenborg M: Titanium dioxide induced chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes. International Archives of Occupation and Environmental Health 61: 1-6, 1998.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Helfestein M., Miragoli M., Rohr S., Muller L., Wick P., Mohr M., Gehr P., Rothen-Rutishauser B: Effects of combustion-derived ultrafine particles and manufactured nanoparticles on heart cells in vitro. *Toxicology* 253: 70-78, 2008.

Holister P., Weener J., Román C., Harper T: Nanoparticles. Científica: Technology White Papers nr. 3, 2003.

Jaeschke H., Gores G.J., Cederbaum A.I., Hinson J.A., Pessayre D., Lemasters J.J: Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicological Sciences* 65: 166-176, 2002.

Jaramillo F., Rincón A. F., Posadas F.A: Toxicología Básica. Textos Universitarios-Ciencias Biomédicas, UAA-U de G-UJED, Primera Edición, 2006.

Johnston H.J., Hutchinson G.R., Christensen F.M., Peters S., Hankin S., Stone V: Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO<sub>2</sub> particulates: The contribution of physicochemical characteristics. *Particle and Fibre Toxicology*. 6:33, 2009.

Kaneo Y, Ogawa K, Tanaka T, Fujihara Y, Iguchi S: A protective effect of glutathione-dextran macromolecular conjugates on acetaminophen-induced hepatotoxicity dependent on molecular size. *Biol Pharm Bull*, 17(10): 1379-1384, 1994.

Kehrer: Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, 23 (1):21-48, 1993.

Kiss B., Biro T., Czifra G., Toth Bl., Kertesz Z., Szikszai Z., Kiss A.Z., Juhasz I., Zouboulious C.C., Hunyadi J: Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Exp Dermatol*. 17: 659-667, 2008.

Klaassen, C.D., Watkins III, J.B. Manual de Toxicología Casarett & Doull: La Ciencia Básica de los Tóxicos. McGraw-Hill Interamericana, México. 981 págs, 2001.

Koppele JM, Mulder GJ: Stereoselective glutathione conjugation by subcellular fractions and purified glutathione-S-transferases. *Drug Metab Rev*, 23: 331-354, 1991.

LeBlanc GA: Hepatic vectorial transport of xenobiotics. *Chem. Biol. Interactions*, 90: 101-120, 1994.

Lindenschmidt RC, Driscoll KE, Perkins MA, Higgins JM, Mourer JK, Belfiore KA: The comparison of a fibrogenic and two non-fibrogenic dusts by bronchoalveolar lavage. *Toxicol Appl Pharmacol*, 102: 268-281, 1990.

Long T.C., Saleh N., Tilton R.D., Lowry G.V., Veronesi B: Titanium Dioxide (p25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ Sci Technol* 40: 4346-4352, 2006.

Ma-Hock L, Gamer AO, Landsiedel R, Leibold E, Frechen T, Sens B, Linsenbuehler M, van Ravenzwaay B: Generation and characterization of test atmospheres with nanomaterials. *Inhal Toxicol*, 19: 833-848, 2007.

Matés J.M: Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153: 83-104, 2000.

Mavon A., Miquel C., Lejeune O., Payre B., Moretto P: In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum comeum distribution of an organic and a mineral sunscreen. *Skin Pharmacol Physiol* 20: 10-20, 2007.

Maxwell RJ: Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 49: 345-361, 1995.

Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC: Nanomedicine-Current status and future prospects. *FASEB J*, 19: 311-330, 2005.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

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.

Oberdorster G: Significance of particle parameters in the evaluation of exposure dose-response relationships of inhaled particles. *Inhalation Toxicology*, 8: 73-89, 1996.

Ophus EM, Rode LE, Gylseth B, Nicholson G, Saeed K: Analysis of titanium pigments in human lung tissue. *Scand J Work Environ Health*, 5: 290-296, 1979.  
Parkin IP, Palgrave R G: *Journal of Materials Chemistry*, 15: 1689, 2005.

Peterson GL: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, 83:346-356, 1977.

Pujalté I., Passagne I., Brouillaud B., Tréguer M., Durand E., Ohayon-Courtés C., L'Azou B., Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Particle and Fibre Toxicology* 8: 10, 2011

Qamar Rahman, Mohtashim L, Elke D, Heidemarie P, Ludwig J, Dieter GW, Dietmar Schiffmann: Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in syrian hamster embryo fibroblast. *Environmental Health Perspectives*, 110(8): 797-800, 2002.

Reed JD: Glutathione-Toxicological Implications. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol*, 30: 603-631, 1990.

Reed JD: Chemical toxicity and glutathione regulation. *Crisp Data Base (NIOH)*, 1994.

Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H: Nanomedicine challenge and perspectives. *Angew Chem Int Ed*, 48: 872-897, 2009.

Ross R: Cleaning the air. *Town Ctry Mag*, April-68, 2007.

Sanvicens N, Marco MP: Multifunctional nanoparticles-properties and prospects for their use in human medicine. *Applied Molecular Receptors*, 18: 26, 2008.

Schlebusch H, Rick W, Lang H, Knedel M: *Dtsch. Med. Wschr*, 99: 765, 1974.

Tavazzi, B., Pierro, D.D., Amorini, A.M., Fazzina, G., Tuttobene, M., Giardina, B., Lazzarino, G: Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *European Journal of Biochemistry* 267, 684–689, 2000.

Thévenod F: Nephrotoxicity and the Proximal Tubule. *Nephron Physiol* 93: 87-93, 2003.

Thevenot P., Cho J., Wavhal D., Timmons R.B., Tang L: Surface chemistry influence cancer killing effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Nanomedicine* 4(3): 226-236, 2008.

Trinder P: Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem*, 6: 24, 1969.

Turrens JF, Freeman BA, Levitt JG, Crapo JD: The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys*, 217: 401-410, 1982.

Valko M, Morris H: Cronin, metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 12: 1161-1208, 2005.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M: Free radicals, metals and oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40, 2006.

Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z: Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett*, 168(2):176-185, 2007.

Wang S, Hou W, Wei L, Jia H, Liu X, Xu B: *Surface and Coating Technology*. 202: 406, 2007.

Warheit DB, Webba TR, Reeda KL, Frerichsb S, Sayesa CM: Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles: different responses related to surface properties. *Toxicology*, 230 (1): 90-104, 2007.

Yamadori I, Oshumi S, Taguchi K: Titanium dioxide deposition and adenocarcinoma of the lung. *Acta Pathol Jpn*, 36: 783-790, 1986.

<http://www.waxxon.com.ar/rev/110/c>.

<http://www.campus-oei.org/revistactsi/numero6/articulo04.htm#3a>.

<http://salud.doctissimo.es/diccionario-medico/celula-t.html>.

<http://es.thefreedictionary.com/bioluminiscencia>.

<http://www.cancer.gov/diccionario?cdrid=46130>.

[http://www.esacademic.com/dic.nsf/es\\_mediclopedia/8907/estrato](http://www.esacademic.com/dic.nsf/es_mediclopedia/8907/estrato).

<http://www.onsalus.com/diccionario/interleucina-8-il-8/16703>.

<http://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/diccionario/nanomateriales.htm>.

<http://salud.glosario.net/terminos-medicos-de-enfermedades/oxidaci%F3n-2971.html>.

<http://www.ibercordones.com>

