



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

Centro de Ciencias Básicas

Departamento de Fisiología y Farmacología

Tesis

Efecto protector de la teofilina y la vitamina E contra el daño provocado por nanopartículas de TiO_2 en tráquea, aorta e hígado de rata Wistar

Tesis que presenta Francisco Moisés Treviño González para optar por el grado de:

Doctorado en Ciencias Biológicas

Comité Tutorial:

Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña

Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores

Dr. Roberto Rico Martínez

Aguascalientes, Ags. Noviembre de 2025



CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

MTRO. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Miembros del Comité Tutorial designado del estudiante FRANCISCO MOISÉS TREVIÑO GONZÁLEZ con ID 32904, quien realizó la tesis titulada: EFECTO PROTECTOR DE LA TEOFILINA Y LA VITAMINA E CONTRA EL DAÑO PROVOCADO POR NANOPARTÍCULAS DE TiO_2 EN TRÁQUEA, AORTA E HÍGADO DE RATA WISTAR, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el VOTO APROBATORIO, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 28 de octubre de 2025.

Dra. en Farm. Ma. Consolación Martínez Saldaña
Director de tesis

Dr. Roberto Rico Martínez
Asesor de tesis

Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

uaa.mx
Código: 17-05-19
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL
EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 26 de noviembre de 2025

NOMBRE: Francisco Moisés Treviño González ID 32904

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Directa LGAC (del posgrado): Toxicología y Bioingeniería Ambiental

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: Efecto protector de la Teofilina y la vitamina E contra el daño provocado por nanopartículas de TiO2 en tráquea, aorta e hígado de la rata Wistar

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

El trabajo presente reafirma efectos nocivos de las nanopartículas de dióxido de titanio en el organismo expuesto, considerando que el contacto a estos compuestos para la población es cada vez más frecuente, ya que su contacto puede ser a nivel industrial, o bien, a nivel comercial, al encontrarse en varios productos de consumo diario. Adicionalmente, se utilizaron compuestos antioxidantes de manera profiláctica para prevenir o amortiguar los efectos que las nanopartículas provocaron. Además de utilizar un fármaco antaño como es la teofilina, en una dosis 5 veces menores de las usuales para generar un efecto antioxidante, el cual hasta hoy es poco utilizado. Dado que la teofilina es una xantina, metabolito de la cafeína, podemos encontrarla no solo como fármaco, sino también como fitoquímico en el café o té. En esencia, el conocimiento de los efectos producidos por las nanopartículas de dióxido de titanio sobre el organismo, y la manera de cómo contrarrestar estos efectos por medio de antioxidantes, es información con una importancia remarcable científica y social.

INDICAR	SI	NO	N.A.	(NO APLICA)	SEGÚN	CORRESPONDA:
Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:						
SI						El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI						La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI						Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI						Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI						Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI						El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI						Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO						Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI						Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:						
SI						Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI						Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI						Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A.						Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI						Coincide con el título y objetivo registrado
SI						Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI						Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI						Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados						
						Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
						El estudiante es el primer autor
						El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
						En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
						Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
						La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

SI X
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCION:

Dr. Edgar Hernández Cuéllar

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, designado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Dr. Alejandro Padilla Díaz

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105P las funciones de Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Escolar/D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEE-FO-15
Actualización: 01
Emisión: 28/04/20



Effect of theophylline on vascular tissue in a model of oxidative stress induced by titanium dioxide nanoparticles

F.M. Treviño-González¹, R.M. Chávez-Morales², F.P. Pacheco-Moisés³, G.G. Ortiz³, H.A. González-Ponce⁴, A.G. Valdivia-Flores⁵ and M.C. Martínez-Saldaña^{6,*}

¹Department of Physiology and Pharmacology, Basic Sciences Center, Autonomous University of Aguascalientes, Av. Universidad #940, Ciudad Universitaria, 20100, Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico.

²Independent author, Aguascalientes, Mexico.

³Neurosciences Division, Western Center for Biomedical Research, Mexican Institute of Social Security, Sierra Mojada #800, Indendencia Oriente, 44340, Guadalajara, Jalisco, Mexico.

⁴Technological Institute of Aguascalientes, Av. Adolfo López Mateos Oriente # 1801, Bona Gens, 20256, Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico.

⁵Department of Veterinary Sciences, Agricultural Sciences Center, Autonomous University of Aguascalientes, Carretera Jesús María-Posta Zootécnica, 20900, Jesús María, Aguascalientes, Mexico.

⁶Department of Morphology, Basic Sciences Center, Autonomous University of Aguascalientes, Av. Universidad #940, Ciudad Universitaria, 20100, Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico.

*Corresponding author: Department of Morphology, Basic Sciences Center, Autonomous University of Aguascalientes, Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria, 20100 Aguascalientes, Aguascalientes, México. (Email: consolacion.martinez@edu.uaa.mx)

This study aimed to test the antioxidant effects of prophylactic low dose Theophylline against oxidative stress in rat aorta induced by a single acute dose of dioxide titanium nanoparticles (TiO₂-NPs). Seventy-two adult Wistar male rats were allocated in four experimental groups (n = 18): control (saline solution, i.g.), Theophylline (2 mg/kg for 5 days, ig), TiO₂-NPs (5 mg/kg, single dose, i.v.), and Theophylline+TiO₂-NPs (2 mg/kg i.g. for 5 days, and then 5 mg/kg i.v., single dose, respectively). Oxidative stress biomarkers such as lipoperoxides, carbonyls, reduced glutathione (GSH) in homogenates of aorta were evaluated; systolic blood pressure, diastolic blood pressure, mean blood pressure and histology of aorta were also evaluated at three experimental times (12, 24 and 168 h post treatments). In oxidative stress tests, TiO₂-NPs increased the levels of lipoperoxides (174%) and carbonyls (132%), while decreased the levels of GSH (48%) compared to control group. The levels of systolic blood pressure (45%), diastolic blood pressure (46%) and mean blood pressure (46%) increased compared to control group. Theophylline group maintained lipoperoxides, carbonyls, systolic blood pressure, diastolic blood pressure and mean blood pressure at levels similar as control levels. In the histologic test TiO₂-NPs group demonstrated signs of rippling that suggest contraction in vascular muscle, these results were not observed in Theophylline+TiO₂-NPs, where it showed similar results to control group. Results in this study suggest that low dose Theophylline protects in a prophylactic way the aorta against oxidative stress induced by a single dose of TiO₂-NPs.

Keywords: 1,3-dimethylxanthine; antioxidant; blood pressure; titania; oxidative response; nitrate stress.

Introduction

Hypertension is a global health problem and its etiology is multifactorial and related to cellular oxidative stress (OS) and disruption of vascular nitric oxide (NO); in 2019, it was reported that 31.1% of the world population (1.39 billion) have hypertension and most cases occur in low- and middle-income countries (LMICs), with health and financial repercussions.¹

A common imbalance in cardiovascular diseases (CVD) is a disruption in the endothelial control of vasodilation. The bioavailability of NO secreted by the vascular endothelium is crucial due to its vasodilatory effect and its impact on peripheral vascular resistance for the control of blood pressure (BP) and tissue perfusion. In vascular OS, the bioavailability of NO decreases due to its reaction with reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion (O₂^{•-}) that generates peroxynitrite (ONOO⁻) that increases nitrate stress (NS) in the blood vessel. The above has a

vasoconstrictive effect accompanied by an increase in peripheral vascular resistance and therefore increased BP.²

There are antioxidant mechanisms that counteract oxidative stress through endogenous and exogenous antioxidants. All cells have endogenous enzymatic and non-enzymatic antioxidant mechanisms. The main non-enzymatic endogenous antioxidant mechanism is glutathione (GSH), which participates in the constitutive response and activation of transcription factor for stress-related action, called nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2).³

On the other hand, there are reports of phytochemicals with antioxidant activity (exogenous antioxidants) producing beneficial effects on the health of the cardiovascular system.⁴ In different plant species there are methylxanthines, which are phytochemicals derived from purines. Among these are Theophylline, caffeine, theobromine and paraxanthine.⁵

Received on 10 November 2024; revised on 30 May 2025; accepted on 6 June 2025

© The Author(s) 2025. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For commercial re-use, please contact reprints@oup.com for reprints and translation rights for reprints. All other permissions can be obtained through our RightsLink service via the Permissions link on the article page on our site—for further information please contact journals.permissions@oup.com.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Universidad Autónomas de Aguascalientes, mi alma mater y mi segunda casa por tanto tiempo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la confianza y la fe que brindan a sus pequeños científicos de todo el país.

A todos los docentes y doctores que se vieron involucrados en la realización de este proyecto, la Dra. Rosa María Chávez Morales y al Dr. Salvador Acevedo Martínez, quienes son los autores primordiales de este proyecto. Al Dr. Fernando Jaramillo Juárez por su bondad y confianza. Al Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores y Dr. Roberto Rico Martínez, por salir al rescate de este proyecto.

Agradecimiento también al personal de laboratorio, siempre presente y siempre con la mejor actitud para trabajar, Diana Ivette Regalado Soto, Sonia Sofía Cruz Muñoz e Irma Guadalupe Reynoso Andeola.

A mi familia, que siempre fue el apoyo que necesité.

Y al final, el agradecimiento más importante va para la Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña. Quién tomó la responsabilidad de consolidar este proyecto, que siempre creyó en mí, estando presente en todos los reverses que se suscitaron, no flaqueando y siempre al pie de lucha junto a mi lado. A usted, muchísimas gracias, eternamente.

Dedicatoria

A todos los que han estado presentes en mi vida, los que siguen y los que ya no, gracias a ustedes soy la persona de hoy en día.



Índice General

Página

1. Introducción.....	10
2. Antecedentes	10
2.1. Características de Nanopartículas de dióxido de titanio.....	10
2.2. Usos y aplicaciones.....	10
2.3. Toxicocinética.....	11
2.4. Mecanismos de toxicidad.....	11
2.5. Teofilina	12
2.6. Vitamina E.....	13
3. Justificación.....	13
4. Hipótesis.....	13
5. Objetivos	14
5.1 Generales.....	14
5.2 Específicos.....	14
6. Material y Métodos.....	14
6.1 Químicos	14
6.2 Caracterización de TiO ₂ -NP	14
6.3 Animales y diseño experimental.....	15
6.4 Determinación de parámetros químicos.....	15
6.5 Determinación de presión sanguínea.....	16
6.6 Análisis histopatológico.....	17
6.7 Análisis estadístico.....	17
7. Resultados.....	17
7.1 Caracterización de TiO ₂ -NP	17
7.2 Tráquea.....	19
7.2.1. Contracción de músculo liso.....	19
7.2.2. Relajación de músculo liso.....	19
7.2.3. GSH.....	20
7.2.4. MDA.....	21
7.2.5. Lipoperóxidos.....	21
7.2.6. Carbonilos.....	22
7.3. Aorta.....	23

7.3.1. Contracción de músculo liso.....	23
7.3.2. Relajación de músculo liso.....	23
7.3.3. Presión arterial sistólica.....	24
7.3.4. Presión arterial diastólica.....	25
7.3.5. Presión arterial media	25
7.3.6. GSH.....	26
7.3.7. MDA.....	27
7.3.8. Lipoperóxidos.....	27
7.3.9. Carbonilos.....	28
7.4 Hígado.....	29
7.4.1. GSH.....	29
7.4.2. MDA.....	29
7.4.3. Lipoperóxidos.....	30
7.4.4. Carbonilos.....	31
7.4.5. Albúmina plasmática.....	31
7.4.6. TGO.....	32
7.4.7. TGP.....	33
8. Discusión.....	33
9. Conclusiones.....	38
10. Referencias.....	39

Índice de Tablas

Página

Tabla 1 Características de TiO₂-NP determinadas por DLS.....19



Índice de Figuras

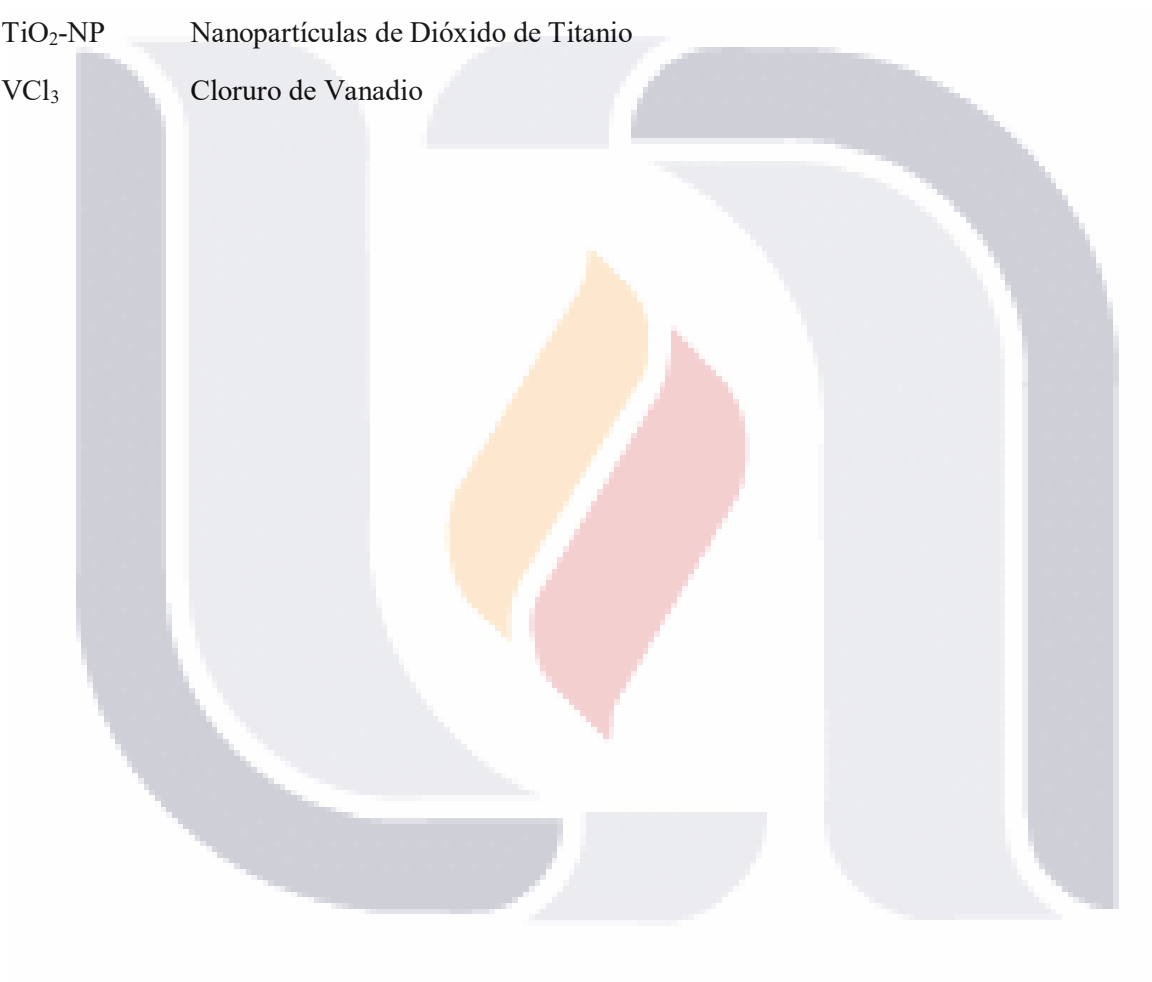
	Página
Figura 1 Microscopía electrónica de TiO ₂ -NP.....	17
Figura 2 Distribución de tamaño por técnica dinámica de dispersión de luz (DLS) por intensidad de TiO ₂ -NP.....	18
Figura 3 Contracción en músculo liso traqueal en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	19
Figura 4 Relajación en músculo liso traqueal en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	20
Figura 5 Concentraciones de GSH en tráquea en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	21
Figura 6 Concentraciones de MDA en tráquea en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	21
Figura 7 Concentraciones de lipoperóxidos en tráquea en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	22
Figura 8 Concentraciones de carbonilos en tráquea en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente	22
Figura 9 Contracción en músculo liso aortico en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	23
Figura 10 Relajación en músculo liso aortico en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	24
Figura 11 Valores de presión arterial sistólica en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	24
Figura 12 Valores de presión arterial diastólica en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	25
Figura 13 Valores de presión arterial media en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	26
Figura 14 Valores de GSH en aorta en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	26

Figura 15 Valores de MDA en aorta en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	27
Figura 16 Valores de lipoperóxidos en aorta en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	28
Figura 17 Valores de carbonilos en aorta en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	28
Figura 18 Valores de GSH en hígado en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	29
Figura 19 Valores de MDA en hígado en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	30
Figura 20 Valores de lipoperóxidos en hígado en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	30
Figura 21 Valores de carbonilos en hígado en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	31
Figura 22 Valores de albúmina plasmática en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	32
Figura 23 Valores de TGO en plasma en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	32
Figura 24 Valores de TGP en plasma en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente.....	33

Acrónimos

8-OHdG	8-hidroxidesoxiguanosina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CAT	Catalasa
Cu	Cobre
DDE	trans-2,4-decadeinal
DNPH	2,4-dinitrofenilhidracina
EE	Error Estándar
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
Fe	Hierro
GCL	Glutamate-cysteine ligasa
GGT	Gamma glutamyl transpeptidasa
GPx	Glutación Peroxidasa
GRd	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
H ₂ PO ₄	Ácido Fosfórico
HNE	4-hydroxinonenal
HPO ₃	Ácido Metafosfórico
LOO•	Radical Lipoperoxil
MDA	Malondialdehído
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reducido
NO	Oxido nítrico
O ₂ ⁻	Radical Superóxido
OH•	Radical Hidroxilo
ONOO-	Peroxinitrito
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
PSD	Presión Sanguínea Diastólica
PSM	Presión Sanguínea Media

PSS	Presión Sanguínea Sistólica
SOD	Superóxido Dismutasa
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TGO	Transaminasa Glutámica Oxalacética
TGP	Transaminasa Glutámica Piruvica
TiO ₂	Dióxido de Titanio
TiO ₂ -NP	Nanopartículas de Dióxido de Titanio
VCl ₃	Cloruro de Vanadio



Resumen

La nanotoxicología ha entrado a cada vez más rincones comerciales e industriales por sus características fisicoquímicas. Sin embargo, son diversos estudios los que han demostrado que no son inocuas al encontrarse en contacto con diversos tejidos y órganos del cuerpo humano. Las nanopartículas producen daño mediante la generación de estrés oxidativo y con ello también procesos inflamatorios.

En nuestro estudio, probamos la intoxicación de tráquea, aorta e hígado con nanopartículas de dióxido de titanio (TiO_2) y utilizando teofilina y vitamina E como terapia profiláctica en contra de los efectos de TiO_2 . Para valorar los diferentes efectos, se realizaron pruebas de contracción y relajación de tráquea y aorta, toma de presión arterial, toma de diversos estudios de estrés oxidativos, pruebas de función hepática y estudios histopatológicos de los órganos valorados.

Los resultados mostraron que las TiO_2 tienden a generar estrés oxidativo en los diversos órganos estudiados y en los diferentes estudios realizados. Generando además disminución en la relajación del músculo liso tanto de la tráquea como de la aorta, además de un incremento en la presión arterial evaluada. Las pruebas de función hepática también se mostraron alteradas, así como también en los estudios histopatológicos de los tres órganos estudiados bajo el influjo tóxico de las TiO_2 .

Los efectos profilácticos de la teofilina mostraron mejoría durante las pruebas realizadas frente a la intoxicación por TiO_2 . Sin embargo, la vitamina E no presentó tan buenos resultados como profiláctico, mostrando en algunas ocasiones efectos prooxidantes.

En conclusión, las nanopartículas se seguirán utilizando en diversos ámbitos comerciales e industriales, sin embargo, es imperativo buscar la manera de amortiguar los efectos adversos que con ella acarren.

Palabras clave: Nanopartículas, dióxido de titanio, teofilina, vitamina E, tráquea, aorta, hígado, estrés oxidativo, antioxidantes, inflamación.

Abstract

Nanotoxicology has increasingly entered the commercial and industrial arena due to its physicochemical characteristics. However, several studies have shown that they are not harmless when in contact with various tissues and organs of the human body. Nanoparticles cause damage by generating oxidative stress and, consequently, inflammatory processes.

In our study, we tested the toxicity of the trachea, aorta, and liver with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles, using theophylline and vitamin E as prophylactic therapy against the effects of TiO₂. To assess the different effects, we performed tracheal and aortic contraction and relaxation tests, blood pressure measurements, various oxidative stress studies, liver function tests, and histopathological studies of the evaluated organs.

The results showed that TiO₂ tended to generate oxidative stress in the various organs studied and in the different studies performed. It also caused a decrease in smooth muscle relaxation in both the trachea and aorta, as well as an increase in assessed blood pressure. Liver function tests were also altered, as were histopathological studies of the three organs studied under the toxic influence of TiO₂.

The prophylactic effects of theophylline were improved in tests conducted against TiO₂ poisoning. However, vitamin E did not perform as well as a prophylactic agent, occasionally displaying prooxidant effects.

In conclusion, nanoparticles will continue to be used in various commercial and industrial settings; however, it is imperative to find ways to mitigate their associated adverse effects.

Keywords: Nanoparticles, titanium dioxide, theophylline, vitamin E, trachea, aorta, liver, oxidative stress, antioxidants, inflammation.

1. Introducción

La nanotecnología es una rama que ha tenido un incremento significativo en los últimos años, por lo que hoy en día encontramos diferentes tipos de estos compuestos en diversos productos de uso diario (Aitken et al. 2006), provocando que los usuarios de esos productos estén en constante contacto con los nanomateriales y ya no solo los trabajadores de las industrias productoras (Skocaj et al. 2011). El tamaño nanométrico de las partículas le confiere propiedades distintas (físicas, químicas, mecánicas, eléctricas, fotocatalíticas) a las partículas del mismo compuesto, pero de tamaño mayor (Buzea et al. 2007).

De estos compuestos nanoparticulados resalta por su importancia y su uso constante las nanopartículas de dióxido de titanio ($\text{TiO}_2\text{-NP}$), pues es un compuesto altamente utilizado en diferentes industrias y campos, hoy en día lo encontramos en productos cotidianos como: (a) bloqueadores de sol, (b) cosméticos, (c) productos farmacéuticos, (d) detergentes, (e) alimentos y (f) productos electrónicos (Oberdörster et al. 2006); incluso son utilizadas en procesos de remediación de agua y tierra (Krawczyk et al. 2016).

El uso de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ en diversos productos ha sido influenciado por que se le atribuye una ausencia de efectos tóxicos y colaterales gracias al tamaño nanométrico, sin embargo, han sido ya varios estudios los cuales han demostrado que estos compuestos penetran al interior de las células produciendo un impacto importante en la función celular (Hagens et al. 2007). Las vías de introducción de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ al organismo es predominantemente por vía digestiva (Wang et al. 2007), respiratoria (Choi et al. 2010) y de manera menos impactante por vía dérmica (Senzui et al. 2010), desde las cuales las $\text{TiO}_2\text{-NP}$ pueden llegar al torrente sanguíneo, ser distribuidas por todo el cuerpo y llegar a los distintos órganos. Los datos recabados han demostrado que $\text{TiO}_2\text{-NP}$ pueden producir efectos tóxicos en diversos órganos por medio de estrés oxidativo y respuesta inflamatoria (Shi et al. 2013).

2. Antecedentes

2.1. Características de Nanopartículas de Dióxido de Titanio

Las $\text{TiO}_2\text{-NP}$ forman parte de la familia de óxidos metálicos de transición; existen diferentes polimorfismos conocidos que se encuentran en la naturaleza: (a) anatasa (tetragonal), (b) brookita (ortorrómbico) y (c) rutilo (tetragonal) (Carp et al. 2004). Se trata de un compuesto de uso comercial que tiene propiedades de dispersión de luz, estabilidad química y supuesta ausencia de toxicidad, por lo que representa en sí, un pigmento inorgánico importante en términos de producción industrial mundial; además, de poseer propiedades semiconductoras, presenta sensibilidad a la luz y absorbe radiaciones electromagnéticas cercana a la región ultravioleta (Gupta y Tripathi 2010).

Por la estabilidad en su estado tetravalente y su afinidad al oxígeno, no se encuentra en la naturaleza de forma elemental; el titanio es un metal que muestra resistencia a la corrosión, lo que ofrece excelentes usos en la ingeniería química; cuenta con anfoteridad lo cual lo hace químicamente estable, y se sugiere que por esta propiedad no es atacada por agentes orgánicas o inorgánicas (Seiler 1988).

2.2. Usos y Aplicaciones

Actualmente son varias las aplicaciones en los que se han empleado y los encontramos en diversos productos de consumo diario, los cuales incluyen pinturas, revestimientos, pigmentos y colorantes (57% del mercado), plásticos (26%), papelería (13%); mientras que el 4% restante de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ se

encuentran en cosméticos, cerámicas, tintas de impresoras, vidrio, en alimentos como agente de aclaramiento, etc (Robichaud et al. 2009); además de utilizarse para remediación de tierra y aguas (Krawczyk et al. 2016).

2.3. Toxicocinética

Como ya se ha comentado con anterioridad, las TiO_2 -NP se encuentran en varios productos de uso cotidiano lo que incrementa la posibilidad de contacto con ellas, y el tiempo de exposición, ingresando al cuerpo por varias rutas de administración, siendo la vía gastrointestinal (Wang et al. 2007), respiratoria (Choi et al. 2010) y dérmica (Senzui et al. 2010) las más comunes e importantes, se ha demostrado que por estas vías las TiO_2 -NP llegan al torrente sanguíneo, de donde pueden ser distribuidas por toda la el cuerpo humano. Gracias al crecimiento que se ha estado suscitando en la nanotecnología, podemos encontrarla además en el campo de la medicina en cuestiones terapéuticas (Chen et al. 2013) y diagnósticas (You et al. 2016), y para estos fines se utiliza la vía intravenosa, asegurando así un 100% en la biodisponibilidad de las TiO_2 -NP, como se demuestra en el trabajo de Kreyling et al. (2017a) donde el órgano que tuvo la mayor concentración de TiO_2 -NP por esta vía fue el hígado; en comparación con la vía oral (Kreyling et al. 2017b) que tuvo una mayor concentración de TiO_2 -NP en tubo digestivo y huesos; y la vía traqueal (Kreyling et al. 2017c) la cuál mostró una mayor concentración de TiO_2 -NP a nivel pulmonar. Una que se encuentran dentro de la economía corporal, se ha calculado una vida media que puede variar de 10 hasta 90 días (Fabian et al. 2008), esto dependiendo del órgano en el que se han depositado las TiO_2 -NP; el ingreso al interior de las células es facilitado pero su salida no lo es, incrementando el tiempo de permanencia dentro de las células y disminuyendo la depuración de los órganos de estos nanomateriales (Geraets et al. 2014; Elgrabli et al. 2015).

2.4. Mecanismos de Toxicidad

Varios estudios han demostrado que los efectos tóxicos de las TiO_2 -NP es secundario a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), el estrés oxidativo resultante y a la respuesta inflamatoria en diversos órganos tales como: (a) cerebro (Ma et al. 2010), (b) pulmón (Eydner et al. 2012; Tedja et al. 2012), (c) hígado (Ma et al. 2009; Cui et al. 2011; González-Esquivel et al. 2015), (d) bazo (Li et al. 2010; Sang et al. 2012), (e) riñón (Meena et al. 2012; Gui et al. 2013), (f) testículo (Meena et al. 2015), (g) corazón (Jawad et al. 2011; Savi et al. 2014) y (h) células sanguíneas (Kongseng et al. 2016).

Recordemos que las ERO son moléculas que tienen funciones celulares importantes como en la cadena respiratoria mitocondrial, en las vías de señalización celular o bien como sustancias que representan mecanismo de defensas en contra de agentes externos (Bhattacharya 2015). Los ERO son moléculas inestables con uno o más electrones desapareados y que gracias a esto pueden reaccionar con otras moléculas de diversas estructuras celulares, como son proteínas (Cai and Yan 2013), ácidos grasos poliinsaturados (Kwiecien et al. 2014) y ácido ribonucleicos (Jena 2012).

Las ERO pueden desencadenar la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas naturales, al secuestrar un átomo de hidrógeno de la cadena de metilenos, formándose así un radical lipídico que reacciona con el oxígeno y produce un radical lipoperoxil ($\text{LOO}\cdot$); la lipoperoxidación es una reacción en cadena que genera diversos productos como el malondialdehído (MDA), 4-hydroxinonenal (HNE) y trans-2,4-decadeinal (DDE), que pueden a su vez oxidar otras estructuras (Aikens y Dix 1991).

Las proteínas son atacadas por las ERO alterando las estructuras mediante diversas reacciones oxidativas que incluyen: a) ataque a los enlaces insaturados, b) escisión o rotura de la cadena de polipéptidos, c) formación de enlaces cruzados y de hidroxiperóxidos, d) hidroxilación de anillos aromáticos y de las cadenas laterales de aminoácidos, e) nitración de aminoácidos, f) Oxidación de grupos sulfhidrilo y de residuos de metionina y g) transformación de aminoácidos en grupos carbonilos; estas modificaciones que sufren las proteínas constituyen una alteración no solo en la estructura, sino también en la función original y a la inhibición de su degradación (Ponczek y Wachowicz 2005).

Las ERO, así como compuestos electrofílicos productos de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, son capaces de oxidar al ácido desoxirribonucleico (ADN) produciendo aductos, que si no son reparados pueden producir mutaciones genéticas, evento que puede conducir al cáncer (Starvridis 2008; Barrera 2012). El radical libre con mayor responsabilidad en el daño al ADN es el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) producido por el cobre (Cu) y el hierro (Fe) que se encuentran en la cromatina; dicho $\cdot\text{OH}$ reacciona con los componentes del ADN alterando las bases de purina y pirimidina, así como la estructura de desoxirribosa; la lesión más conocida y estudiada es la relacionada con la formación de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG), la cual puede funcionar como un biomarcador (Halliwell y Gutteridge 1999).

Un blanco también importante de las ERO son los compuestos proteicos, donde uno de los procesos más importantes es la carbonilación de proteínas, el cuál es una reacción irreversible y de donde se forman los denominados grupos carbonilos, que son utilizados como biomarcadores de procesos oxidativos en proteínas (Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández 2006).

Para esto, las células cuentan con un arsenal para defenderse como son sustancias antioxidantes internas: a) glutatión reducido (GSH), b) catalasa (CAT), c) superóxido dismutasa (SOD), d) glutatión reductasa (GRd), e) glutatión peroxidasa (GPX) y f) ácido úrico; sustancias externas que funcionan como antioxidantes son varias y algunos ejemplos son: a) vitamina E, b) vitamina C y c) flavonoides (Birben et al. 2012).

2.5. Teofilina

La teofilina (1,3-dimetilxantina) es un fármaco perteneciente al grupo de las xantinas, las cuales se tratan de dioxipurinas y guardan relación estructural con el ácido úrico (Morita et al. 1984). Lo podemos encontrar en gránulos de café y en las hojas de té verde; se trata de un fármaco que desde sus inicios, hace más de 70 años, se ha utilizado como tratamiento de padecimientos obstructivos broncopulmonares como es el asma por sus propiedades broncodilatadoras (Evans et al. 1997); además, se ha utilizado como estimulante nervioso en la apnea prematura del prematuro (Henderson-Smart y Steer 2010).

La teofilina tiene la desventaja de poseer una ventana terapéutica estrecha, es decir, que su dosis terapéutica se encuentra muy cercana a la dosis tóxica, por lo que durante su uso es frecuente ver efectos adversos secundarios (Barnes 2003); sin embargo, se ha demostrado que a dosis bajas, por debajo de las sub broncodilatadoras, la teofilina presenta efectos antioxidantes e incluso antiinflamatorias, tales efectos pueden ser los que mayor impacto terapéutico tengan en las enfermedades broncopulmonares (Ezeamuziel 2001). Los efectos antioxidantes de la teofilina son variados, se ha descrito que es capaz de inhibir enzimas generadoras de ERO como es la NADPH oxidasa lo que produce una disminución en la formación del radical superóxido (O_2^-) en células como macrófagos y eosinófilos (Hendeles et al. 1985); inhibición de mieloperoxidasas lo que evita la formación de $\text{OH}\cdot$ (Ezeamuziel 2001); la demetilación que sufre la estructura frente a radicales libres

lo que desencadena una cascada antioxidante al donar electrones (Santos et al. 2010); dicha cascada termina cuando la molécula llega hasta un estado básico como es el ácido úrico, el cual también cuenta con efectos antioxidantes (Lapenna et al. 1995), en su caso en específico puede ser el ácido 1,3-dimetilúrico y el ácido 1-metilúrico (Sunil Paul et al. 2014). Chorostowska-Wynimko et al (2007) sugieren que el efecto sobre la inhibición de fosfodiesterasa también puede estar implicado en los efectos antioxidantes del fármaco.

2.6. Vitamina E

La vitamina E es probablemente el micronutriente más estudiado como antioxidante (El-Shenawy et al. 2010; Venkata Subbaiah et al. 2015) desde su descubrimiento (Evans y Bishop 1920); en su estado natural contiene ocho diferentes formas de isómeros: cuatro tocoferoles (α , β , γ , δ) y cuatro tocotrienoles (α , β , γ , δ) (Brigelius-Flohé y Traber 1999). La forma más metilada y que supuestamente tiene mayor actividad antioxidante es la del α -tocoferol, el cual se deriva de un tocol, que consiste en un anillo central cromanol al que se une una cadena lateral saturada de fitol; esta la podemos encontrar naturalmente en vegetales verdes, granos, nueces, huevo, leche y varios aceites vegetales (Farbstein et al. 2010).

Este micronutriente ha sido utilizado como protector de la membrana celular contra la lipoperoxidación (Niki 1987), esto lo hace al interactuar con el radical lípido peroxilo, previniendo la generación de un nuevo radical que pudiese perpetuar una reacción en cadena, la eliminación del radical peroxilo es mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno; al perder este átomo se convierte en un radical tocoferilo, el cual también es inestable y reactivo pero no tan dañino como otros radicales conocidos y tiene la ventaja de que puede ser reducido nuevamente por la vitamina C o la coenzima Q (Dogru 2003); es capaz de eliminar ERO como el O_2^- y el OH^\bullet ; su sitio activo se encuentra en el grupo 6-hidroxilo del grupo cromanol que se sitúa en la membrana cerca de la superficie polar, mientras que la cadena fitilo lo hace junto a los fosfolípidos en su región no polar (Kaya 2009). Sin embargo, a pesar de que se ha demostrado el efecto protector y antioxidante de la vitamina E en estudios experimentales básicos, en diferentes estudios clínicos no se ha observado una notable mejoría con el uso de este micronutriente para diversas patologías, entre ellas las cardíacas (Miller et al. 2005; Singh et al. 2005).

3. Justificación

Las TiO_2 -NP ejercen efectos nocivos sobre diferentes tejidos, mediante la producción de ERO, sin embargo, sus efectos sobre la aorta y la tráquea *in vivo* se desconocen.

Se tiene la necesidad de conocer los efectos de las TiO_2 -NP en estos tejidos y valorar la capacidad protectora de la teofilina y la vitamina E mediante mecanismos antioxidantes de hígado, aorta y tráquea.

4. Hipótesis

La teofilina y la vitamina E reducen el daño oxidativo generado por la intoxicación aguda con TiO_2 -NP en hígado, aorta y tráquea de rata Wistar Macho.

5. Objetivos

5.1. Generales

Analizar el efecto profiláctico de la teofilina y vitamina E sobre el daño provocado por la intoxicación con TiO₂-NP en rata Wistar macho.

5.2. Específicos

Tráquea:

- Determinar los cambios en el músculo liso.
- Cuantificar los cambios en la concentración de GSH, MDA, lipoperóxidos, carbonilos, nitritos y nitratos.
- Analizar la estructura histológica.

Aorta:

- Determinar los cambios en el músculo liso.
- Determinar los cambios en la presión arterial.
- Cuantificar los cambios en la concentración de GSH, MDA, lipoperóxidos, carbonilos, nitritos y nitratos.
- Analizar la estructura histológica.

Hígado:

- Cuantificar los cambios en la concentración de GSH, MDA, lipoperóxidos, carbonilos, nitritos, nitratos, albúmina plasmática, transaminasa glutámica oxalacética (TGO) y transaminasa glutámica pirúvica (TGP).
- Analizar la estructura histológica.

6. Material y Métodos

6.1. Químicos

Nanopolvo de dióxido de titanio fue adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), se preparó un stock en solución salina (3 mg/ml). Polvo de teofilina fue adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), un stock con suspensión de teofilina en solución salina al 0.9% fue preparado (1.29 mg/ml). La fuente de vitamina E (α -tocoferol) fue la presentación farmacéutica Eternal E® de Bayer® (Madrid, España) y se preparó una suspensión en un stock añadiendo una capsula (400 mg) por cada 10 ml de aceite vegetal (40 mg/ml). El kit FR12 para detección de lipoperóxidos fue adquirido de Oxford Biomedical Research® (Oxford, MI, USA). Los reactivos para albúmina plasmática, TGO y TGP fueron adquiridos de Spinreact® (Girona, España).

6.2. Caracterización de TiO₂-NP

Las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂-NP) fueron caracterizadas por microscopia electrónica. Se preparó una suspensión de TiO₂-NP en isopropanol y se dispersó por sonicación. 15 μ l de esta suspensión se vertieron en 300 mallas de redes de cobre, subsecuentemente fueron secadas con una

lámpara de luz blanca por 25 min. Las muestras fueron analizadas usando un microscopio electrónico de alta resolución S/TEM (JEM-ARM200F, JEOL, Japón). Se preparó otro stock de TiO₂-NP (3 mg/ml) para la determinación del tamaño la técnica dinámica de dispersión de luz (DLS, por sus siglas en inglés) y para la medición del potencial Z usando un Zetasizer Nano Zs90 (Malvern, Instrument Ltd., UK). Los resultados fueron analizados usando un Zetasizer software Ver. 7.12.

6.3. Animales y Diseño Experimental

Un total de 108 ratas Wistar macho con un peso de 280 ± 20 g fueron utilizadas y mantenidas en cajas de acero inoxidable con un régimen de luz/oscuridad de 12 h, se le proporcionó alimento y agua *ad libitum* en una habitación con una temperatura de 24 ± 1 °C en el bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Usamos 18 ratas por tratamiento, divididas en 3 tiempos experimentales: 12, 24 y 168 h (n = 6 por grupo/tiempo). Las ratas fueron manejadas acorde a la *Guía de Principios en el Uso de Animales en Toxicología*. Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Los animales fueron aleatoriamente divididos y colocados en seis diferentes grupos: I) Grupo control (solución salina al 0.9% intragástrico); Grupo teofilina fue tratada con dosis diarias de teofilina (2 mg/kg de peso corporal, intragástrico) por 5 días; III) Grupo vitamina E fue tratada con dosis diarias de vitamina E (4 mg/kg de peso corporal, intragástrico) por 5 días; IV) Grupo TiO₂-NP fue intoxicado con una dosis única de TiO₂-NP (5 mg/kg de peso corporal, intravenoso); V) Grupo teofilina + TiO₂-NP fue tratado con dosis diarias de teofilina (2 mg/kg de peso corporal, intragástrico) por 5 días más una dosis única de TiO₂-NP (5 mg/kg de peso corporal, intravenoso); y VI) Grupo vitamina E + TiO₂-NP fue tratado con dosis diarias de vitamina E (4 mg/kg de peso corporal, intragástrico) por 5 días más una dosis única de TiO₂-NP (5 mg/kg de peso corporal, intravenoso).

Los tiempos experimentales fueron seleccionados para evaluar efectos tempranos y tardíos de esta manera: 12, 24 y 168 h (7 días) posterior al término del tratamiento correspondiente.

Para el sacrificio, las ratas fueron anestesiadas vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (43 mg/kg de peso corporal). Las muestras sanguíneas fueron obtenidas a través de punción cardíaca. Los tejidos fueron perfundidos con solución de lavado, posteriormente el hígado, la aorta y la tráquea fueron removidas, una parte de estos tejidos fueron sumergidos en formolaldehído al 10% y el resto fue homogenizado para pruebas bioquímicas.

6.4. Determinación de Parámetros Químicos

1) Para GSH, 250 mg del tejido homogenizado fueron colocados en 3.75 ml de solución buffer de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) con un pH de 8.0, después se agregaron 1.5 ml de ácido metafosfórico (HPO₃), esta mezcla fue centrifugada a 5,000 rpm a 4 °C por 30 min. Después, 0.5 ml del sobrenadante fueron tomados y colocados en un tubo con 4.5 ml de PBS con pH 8.0, y de esta mezcla se tomaron 100 µl para colocarlos en un tubo con 1.8 ml de PBS con pH 8.0, después se colocaron a este tubo 100 µl de phthaldehído al 0.1%. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, la fluorescencia de las muestras fue leídas con un espectrofotómetro de luminiscencia 50B (Perkin Elmer®) con emisión de 420 nm, excitación de 350 nm, Slit 5.0 y tiempo de 5 s, acorde a Hissin y Hilft (1976).

2) Para MDA, 100 mg del tejido homogenizado fueron colocados en 1 ml de PBS con pH al 7.4. Después, en otro tubo se mezclan 1.5 ml de ácido fosfórico (H₂PO₄) al 1%, 0.5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés) y 200 µl de la muestra inicial; estas mezclas fueron

calentadas en baño maría a 94 °C durante 45 min. Cuando las mezclas se enfriaron a temperatura ambiente, se agregaron 2 ml de butanol a cada tubo y después fueron centrifugados a 2,500 rpm por 10 min. La absorbancia de la fase orgánica fue leída a 530 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (DMS80 Varian®), de acuerdo al protocolo de Esterbauer y Chessemann (1990).

3) Para lipoperoxidos, 20 µl de tejido homogenizado fueron colocados en 480 µl de Buffer Tris-HCL, después 100 µl de esta solución fueron colocadas en un microtubo, y se 400 µl del reactivo FR12 fueron agregados, estas muestras fueron calentadas en baño maría a 45 °C por 30 min, posterior a esto las muestras fueron colocadas en hielo, y luego centrifugadas a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C. Las muestras fueron colocadas en un aplanca de 96 pozos para leer la absorbancia a 586 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (BIO RAD Benchmark plus®), acorde al protocolo de Esterbauer y Chessemann (1990).

4) Para carbonilos, 20 µl de tejido homogenizado fueron tratado con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) a 10 mM por 1 h. La proteína fue precipitada con ácido tricloroacético (TCA), después las muestras fueron centrifugadas tres veces con etanol-etilacetato (1:1) como lavados, posterior a esto las muestras fueron disueltas en guanidina a 6 M. Las muestras fueron colocadas en una placa de 96 pozos para leer la absorbancia a 370 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (BIO RAD Benchmark plus®), acorde al protocolo de Levine et al (1990).

5) Para nitritos y nitratos, 100 µl de tejido homogenizado fueron colocado en un microtubo y posteriormente, se agregaron secuencialmente 100 µl de cloruro de vanadio (VCl₃), 50 µl de sulfanilamida y 50 µl de diclorhidrato de N-(1-naftil)etilendiamina. Se incubaron a temperatura ambiente por 45 min, después se tomó una alícuota de 200 µl del sobrenadante y se colocaron en un aplanca de 96 pozos para leer la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (BIO RAD Benchmark plus®), acorde al protocolo de Tenorio et al (2005).

6) Para TGO y TGP, 1 ml de reactivo de TGO y TGP fueron colocados en tubos de 5 ml y se dejaron estabilizar en temperatura ambiente, después 100 µl de plasma fueron agregados a los tubos para leer la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (DMS80 Varian®), acorde al protocolo de Tietz (1995).

7) Para albúmina plasmática, 1 ml de reactivo de albúmina plasmática fueron colocados en tubos de 5 ml, después 10 µl de plasma fueron colocados en los tubos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 min. La absorbancia fue leída a 630 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (DMS80 Varian®), acorde al protocolo de Doumas et al (1971).

6.5. Determinación de Presión Sanguínea

Los valores de la presión sanguínea sistólica (PSS) y diastólica (PSD) fueron obtenidos de manera directa por medio de cateterización de la arteria carótida derecha; todos estos valores fueron adquiridos de un transductor P-100B Narco bio-system conectado a un canal de amplificación tipo 7070, y a un acoplador tipo 7173 Narco bio-system, este a una interfase DMA TL-1 de Axon instruments®. Los datos fueron visualizados usando un software Axotape versión 2 de Axon instruments®. La presión sanguínea media (PSM) fue calculada con la siguiente ecuación:

$$PSM = \frac{1}{3}(PSS - PSD) + PSD$$

6.6. Análisis Histológico

Posterior a la perfusión de los tejidos, se tomaron fragmentos de hígado, aorta y tráquea y se dejaron en fijación en formolaldehído. Después se incrustaron en bloques de parafina, para hacer cortes de los tejidos de 5 μm , estos fueron teñidos con hematoxilina y eosina en un tren de tinción (Leica ST4040 Leica Biosystems®). Los tejidos fueron cuidadosamente examinados bajo un microscopio de luz (Carl Zeiss® Axioskop 40), acoplada a una cámara Cool SNAP-Pro de Media Cybernetics®. Todas las imágenes fueron analizadas usando el software Image Pro Plus (versión 4.5.0.19) de Media Cybernetics®.

6.7. Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados en media \pm un error estándar (EE). Se realizó ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey de las muestras y presiones sanguíneas, usando el software Prism 6 (GraphPad Software Inc.®). Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas a base del nivel de probabilidad de $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1. Caracterización de $\text{TiO}_2\text{-NP}$

Un microscopio electrónico fue utilizado para evaluar tamaño, forma y agregación de $\text{TiO}_2\text{-NP}$. Como se muestra en la figura 1, $\text{TiO}_2\text{-NP}$ tienden a formar aglomerados de distintos tamaños los cuales pueden llegar a ser tan grandes como 1 μm (Figura 1a, b), incluso cuando la muestra fue sonificada. Los aglomerados que se vieron más comúnmente fueron de 200 – 400 nm de diámetro (Figura 1c-e). Además, los aglomerados más pequeños fueron de 100 nm, formado por siete a 15 nanopartículas (Figura 1f-h). Acorde al análisis microscópico, la distribución del tamaño de nanopartícula (Figura 2) y la determinación del potencial Z (tabla 1) determinados por DLS, muestran que las $\text{TiO}_2\text{-NP}$ están polidispersas y aglomeradas en grupos de 100 – 200 nm (Figura 2a), con una media de 169.5 nm (Tabla 1); e incluso después de 5 min, las $\text{TiO}_2\text{-NP}$ continuaban formando aglomerados de 200 – 800 nm y 2 – 5 μm (Figura 2b), con media de 412.7 nm y 4699.83 nm, respectivamente (Tabla 1).

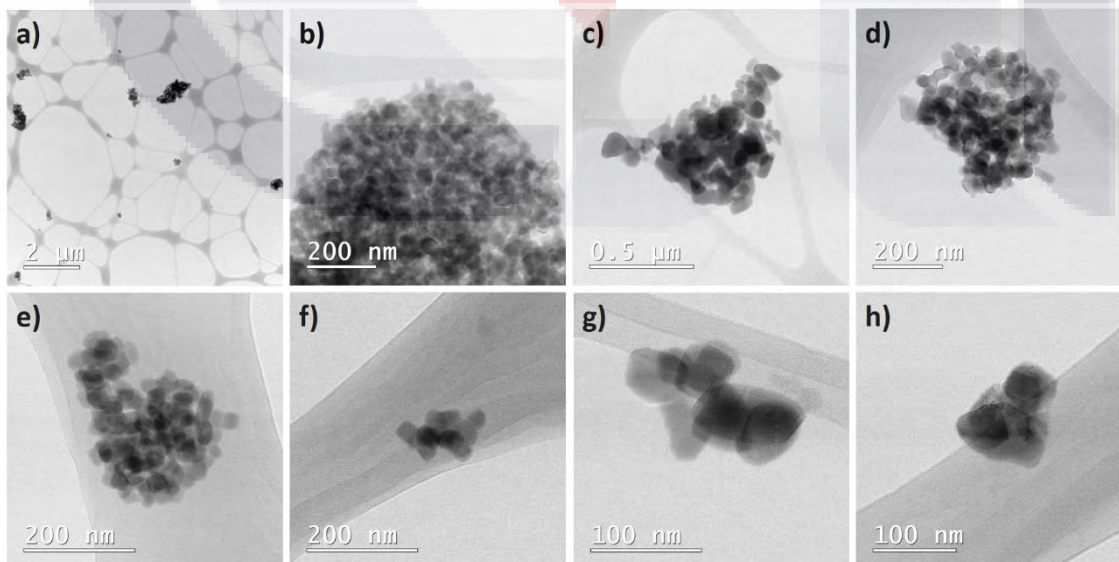


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ en magnificación baja (a) y media (b–h).

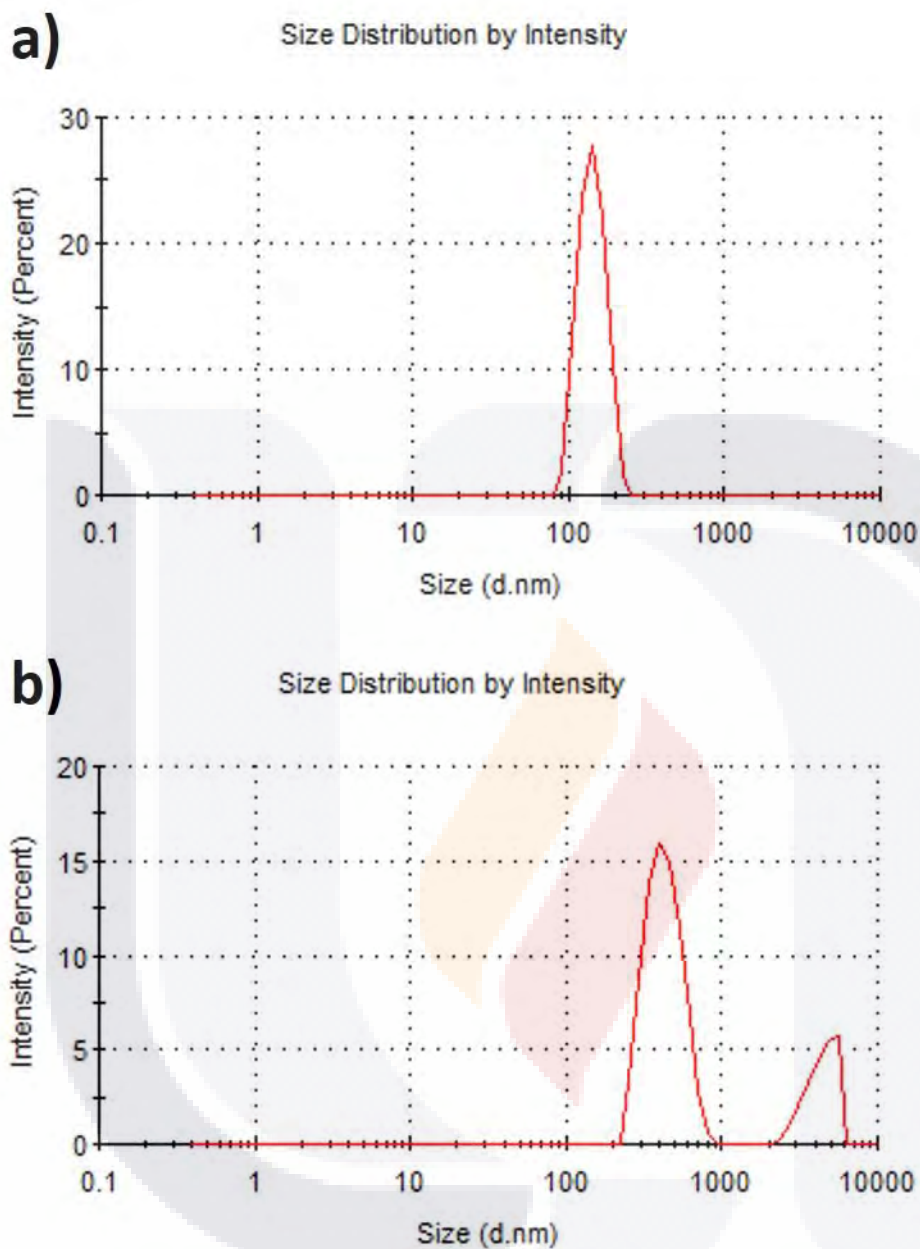


Figura 2. Distribución de tamaño por técnica dinámica de dispersión de luz (DLS) por intensidad de $\text{TiO}_2\text{-NP}$. Distribución de aglomerados de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ fue medido inmediatamente (a) y 5 min después de la sonicación (b).

Tabla 1 Características de TiO₂-NP determinadas por DLS.

Tiempo (min)	Promedio-Z (nm)	Pico Medio 1 (nm)	Pico Medio 2 (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
0	163.46	169.95	412.7	0.088	-17.15
5	516.41	0	4699.83	0.387	-23.6

7.2. Tráquea

7.2.1. Contracción Músculo Liso

Los resultados frente a un agente constrictor en músculo liso de tráquea mostraron un incremento significativo en el grupo TiO₂-NP a las 24 h con respecto al grupo control, mientras que los grupos teofilina + TiO₂-NP y vitamina E + TiO₂-NP a las 24 h presentaron disminución significativa con respecto al grupo TiO₂-NP a las 24 h. Todo esto se observa en la figura 3.

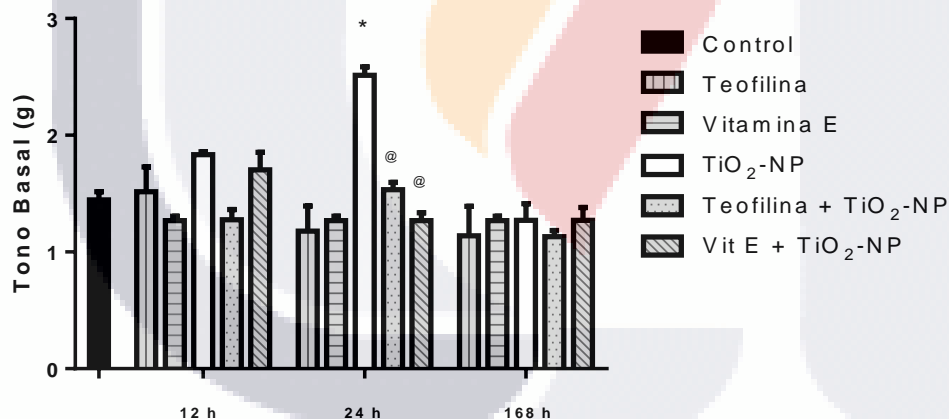


Figura 3. Contracción en músculo liso traqueal en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg, ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. @ diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 24 h. p < 0.05.

7.2.2. Relajación Músculo Liso

Los resultados frente a un agente relajante en músculo liso traqueal mostraron disminución significativa con respecto al grupo control en los grupos vitamina E (12, 24 y 168 h), TiO₂-NP a las

12 h, teofilina + TiO₂-NP (12, 24 y 168 h) y vitamina E + TiO₂-NP (12, 24 y 168 h). Todo esto se observa en la figura 4.

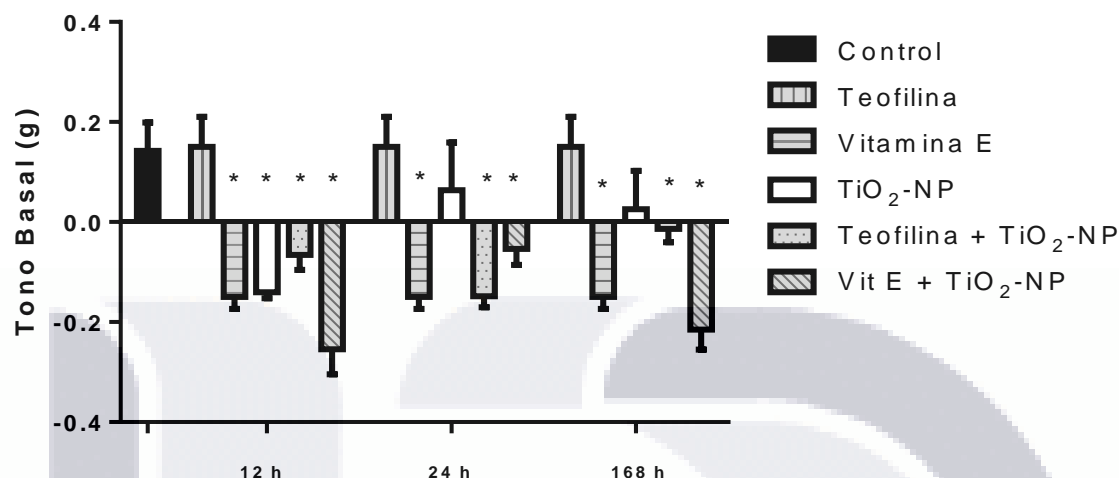


Figura 4. Relajación en músculo liso traqueal en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. @ diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 24 h. p < 0.05.

7.2.3. GSH

Al evaluar las concentraciones de GSH en tráquea en los distintos grupos y tiempos experimentales, llama la atención el incremento obtenido en los grupos teofilina en todos los tiempos experimentales con respecto al grupo control. Los demás grupos no presentaron diferencia significativa con respecto al grupo control. El grupo Vitamina E + TiO₂-NP presentó diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP a las 168 h, todo esto se muestra en la figura 5.

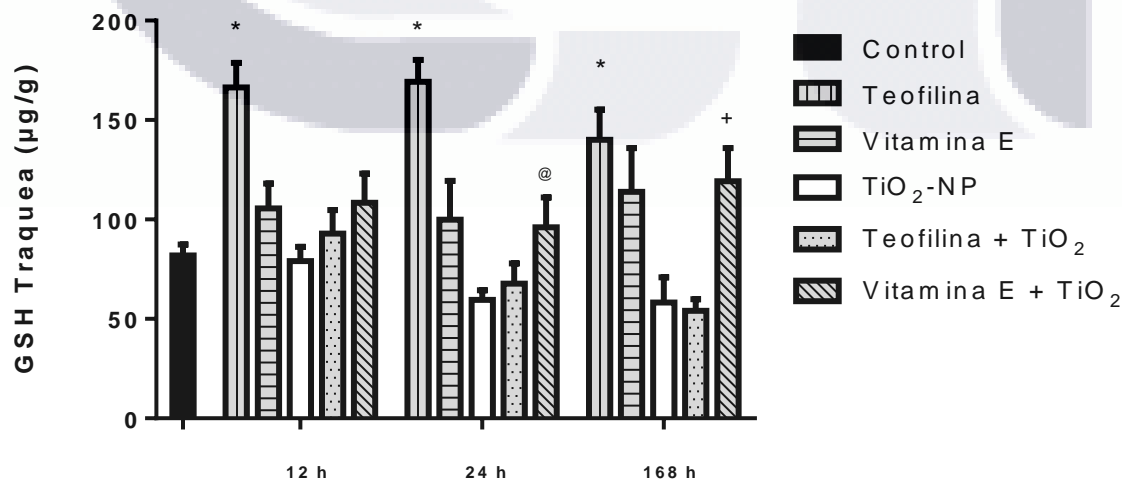


Figura 5. Concentraciones de GSH en tráquea en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. @ diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 24 h. + diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 168 h. p < 0.05.

7.2.4. MDA

Los resultados en las concentraciones de MDA en la tráquea, mostraron una disminución significativa con respecto al grupo control en el grupo teofilina y teofilina + TiO₂-NP a las 12 h posteriores al término del tratamiento correspondiente. A las 168 h existe un incremento en el grupo TiO₂-NP con respecto al grupo control; todo esto se observa en la figura 6.

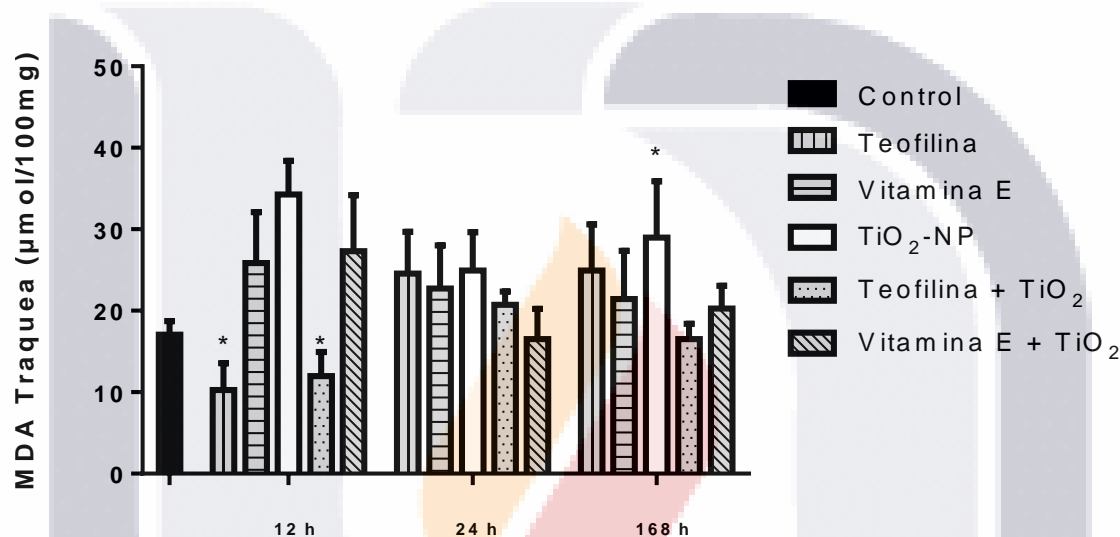


Figura 6. Concentraciones de MDA en tráquea en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. p < 0.05.

7.2.5. Lipoperóxidos

Los resultados de lipoperóxidos en tráquea mostraron una disminución significativa en el grupo teofilina a las 12 h con respecto al grupo control; mientras tanto a las 24 h se observó un incremento significativo en el grupo TiO₂-NP con respecto al grupo control, pero los grupos teofilina + TiO₂-NP y vitamina E + TiO₂-NP mostraron concentraciones similares a las del control; esto se observa en la figura 7.

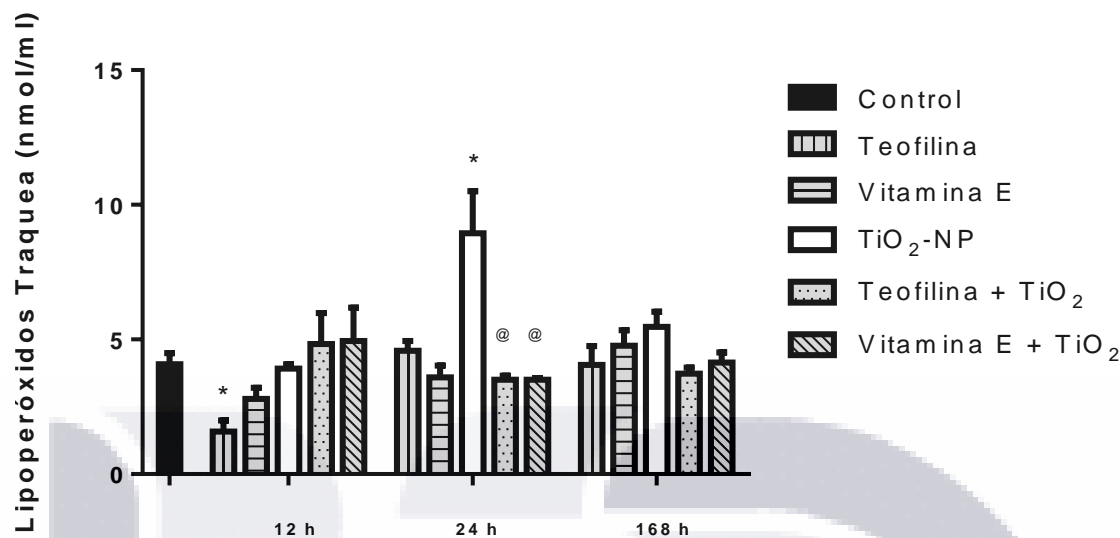


Figura 7. Concentraciones de lipoperóxidos en tráquea en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. @ diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 24 h. p < 0.05.

7.2.6. Carbonilos

Los resultados de concentraciones de carbonilos en la tráquea mostraron disminución significativa con respecto al control en los grupos teofilina, vitamina E a las 12 h y teofilina a las 24 h; mientras tanto hubo un incremento significativo con respecto al control en los grupo vitamina E + TiO₂-NP a las 24 y 168 h, asimismo, estos grupos tuvieron un incremento significativo con los grupos TiO₂-NP a las 24 y 168 h, respectivamente. Todo esto se observa en la figura 8.

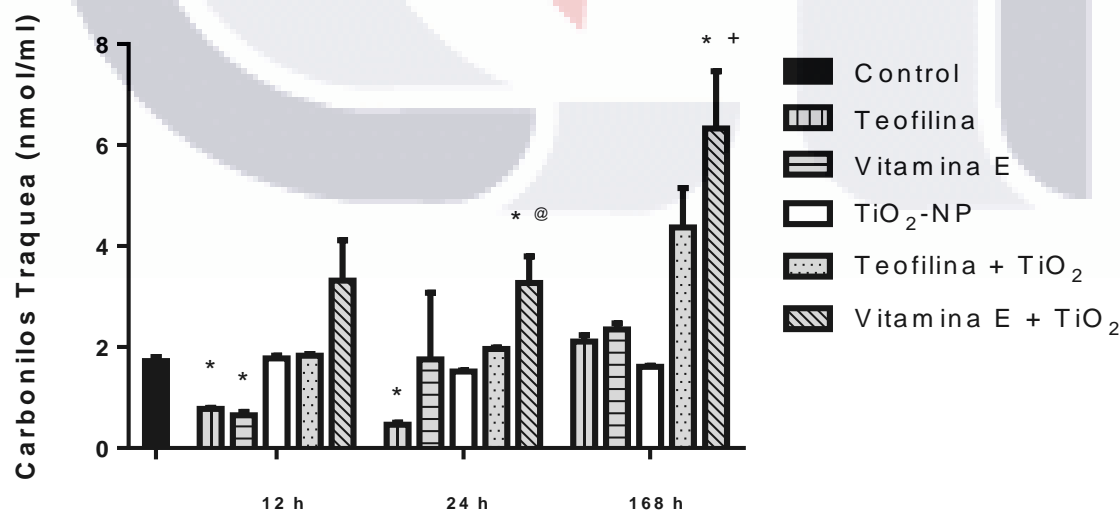


Figura 8. Concentraciones de carbonilos en tráquea en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina

+ TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. @ diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 24 h. + diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 168 h. p < 0.05.

7.3. Aorta

7.3.1. Contracción Músculo Liso

Los resultados frente a un agente constrictor en el músculo liso aórtico mostraron incremento significativo con respecto al grupo control en los grupos TiO₂-NP (12 y 24 h) y teofilina + TiO₂-NP a las 24 h. Mientras que los grupos teofilina + TiO₂-NP y vitamina E + TiO₂-NP a las 12 h mostraron una disminución significativa con respecto al grupo TiO₂-NP a las 12 h. Todo esto se observa en la figura 9.

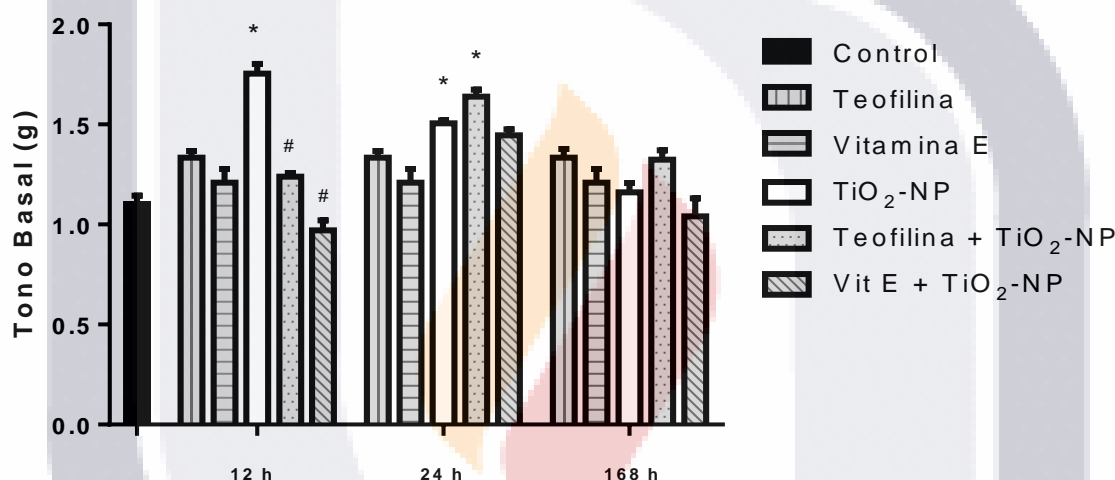


Figura 9. Contracción en músculo liso aórtico en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg, ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. # diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 12 h. p < 0.05.

7.3.2. Relajación Músculo Liso

Los resultados frente a un agente relajante en el músculo liso aórtico mostraron incremento significativo en el grupo TiO₂-NP a las 12 h con respecto al grupo control; así mismo, hay disminución significativa con respecto al grupo control en los grupos teofilina (12, 24 y 168 h), vitamina E (12, 24 y 168 h) y TiO₂-NP a las 168 h. Mientras que los grupos teofilina + TiO₂-NP a las 12 h, vitamina E + TiO₂-NP a las 12 y 24 h mostraron una disminución significativa con respecto a los grupos TiO₂-NP en los tiempos experimentales respectivos. Todo esto se observa en la figura 10.

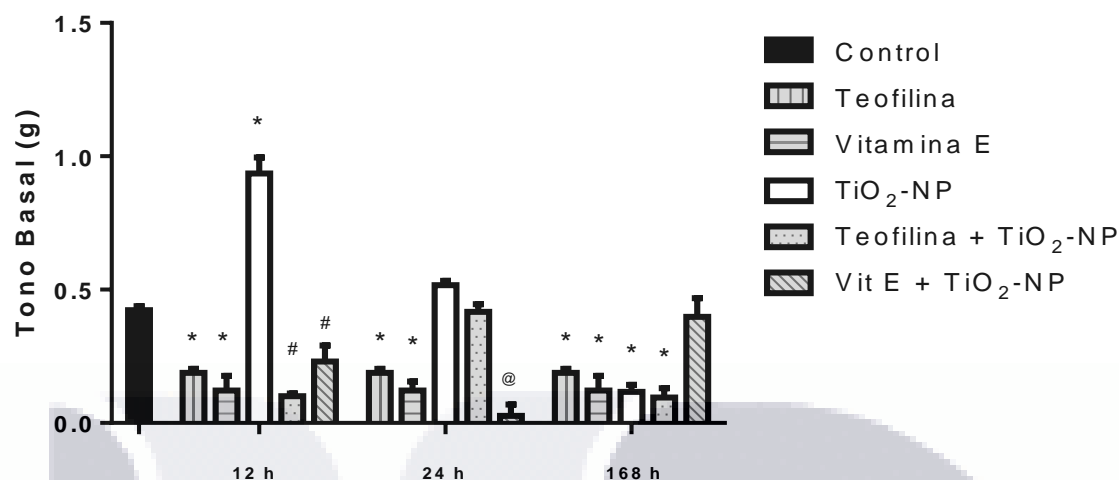


Figura 10. Relajación en músculo liso aortico en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. # diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 12 h. @ diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 24 h. p < 0.05.

7.3.3. Presión Arterial Sistólica

Los resultados de presión arterial sistólica mostraron incremento significativo en los grupos TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h con respecto al grupo control. Mientras tanto los grupos teofilina + TiO₂-NP y vitamina E + TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h presentaron una disminución significativa con respecto a los grupos TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h, respectivamente. Todo esto se observa en la figura 11.

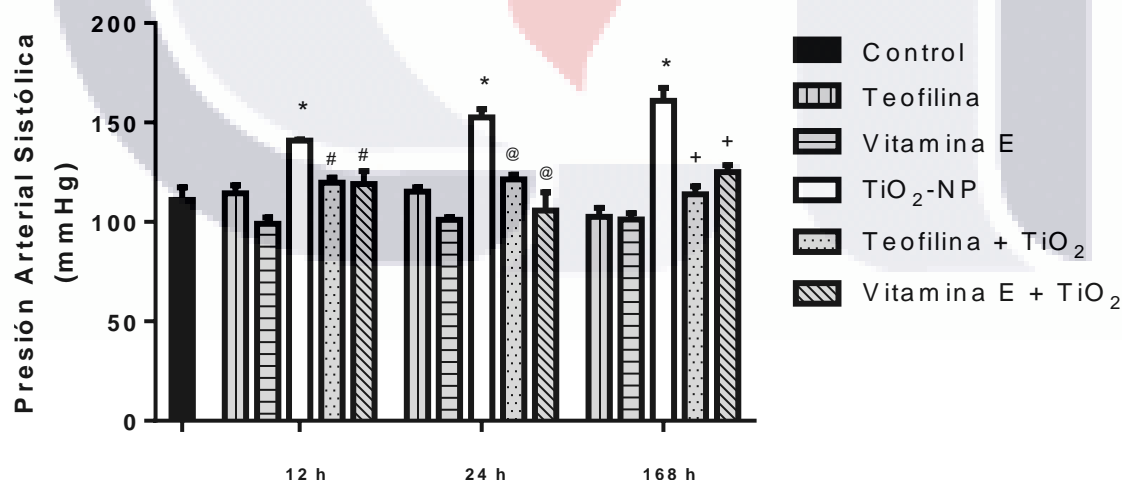


Figura 11. Valores de presión arterial sistólica en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. # diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 12 h. @ diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 24 h. + diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 168 h. p < 0.05.

respecto al grupo TiO₂-NP 12 h. @ diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 24 h. + diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 168 h. p < 0.05.

7.3.4. Presión Arterial Diastólica

Los resultados de presión arterial diastólica mostraron un incremento significativo en los grupos TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h con respecto al grupo control. Mientras tanto los grupos teofilina + TiO₂-NP y vitamina E + TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h tuvieron una disminución significativa con respecto a los grupos TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h, respectivamente. Todo esto se observa en la figura 12.

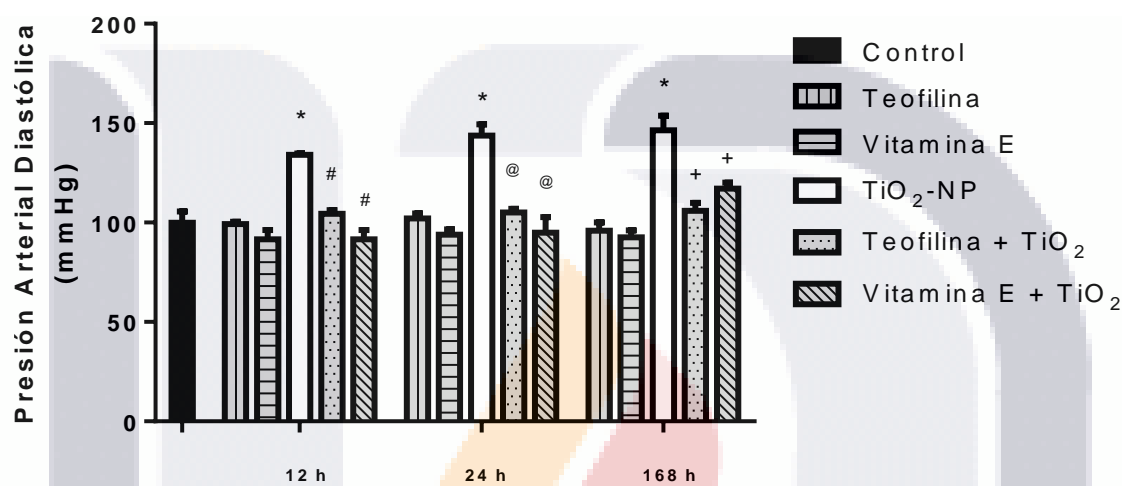


Figura 12. Valores de presión arterial diastólica en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. # diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 12 h. @ diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 24 h. + diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 168 h. p < 0.05.

7.3.5. Presión Arterial Media

Los resultados de presión arterial media mostraron un incremento significativo en los grupos TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h con respecto al grupo control. Mientras que los grupos teofilina + TiO₂-NP y vitamina E + TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h mostraron una disminución significativa con respecto a los grupos TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h, respectivamente. Todo esto se observa en la figura 13.

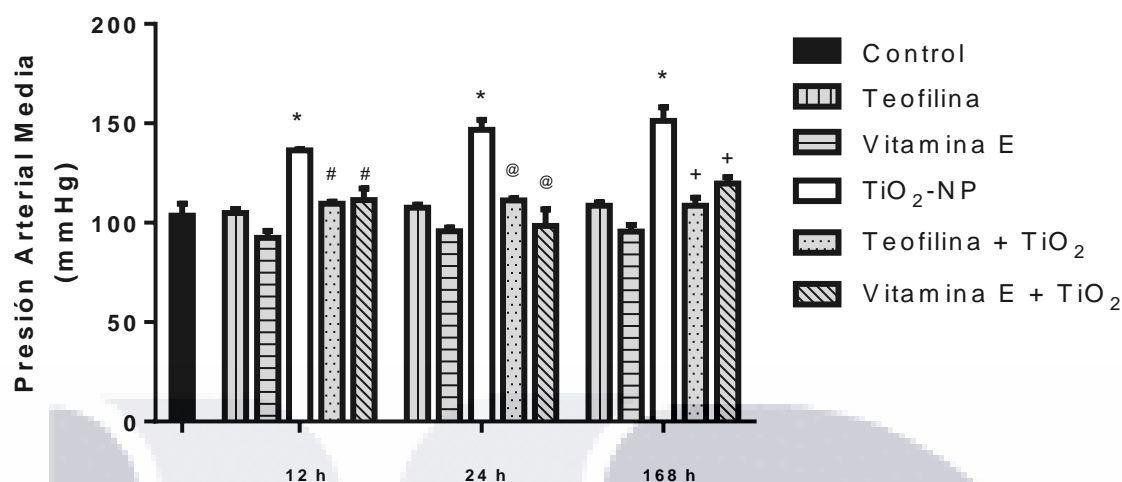


Figura 13. Valores de presión arterial media en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. # diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 12 h. @ diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 24 h. + diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 168 h. p < 0.05.

7.3.6. GSH

Los resultados de GSH en aorta mostraron un incremento significativo en los grupos teofilina a las 12 y 24 h con respecto al control, mientras que hubo una disminución significativa en el grupo TiO₂-NP a las 168 h con respecto al grupo control; y el grupo vitamina E + TiO₂-NP a las 168 h presentó un incremento con respecto al grupo TiO₂-NP al mismo tiempo experimental. Todo esto se observa en la figura 14.

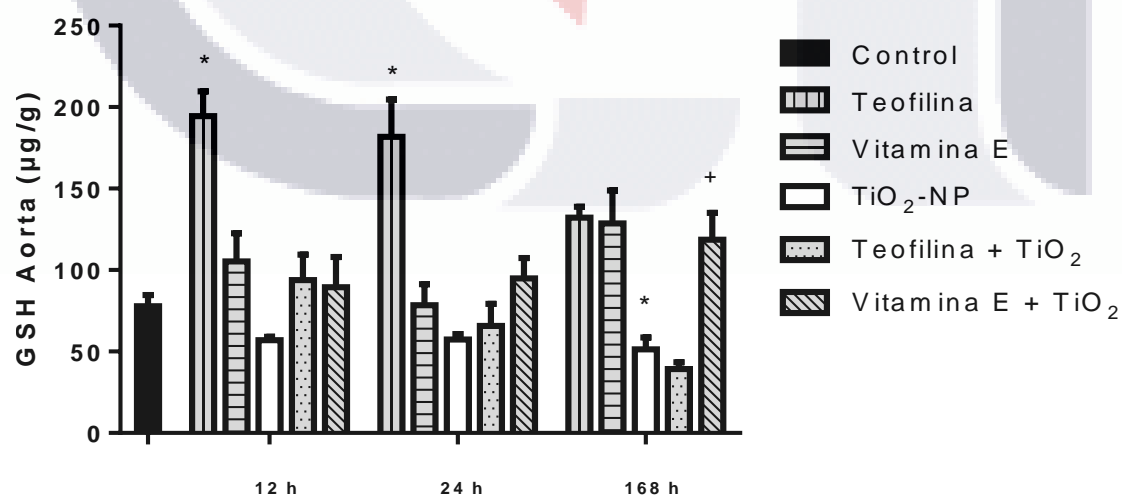


Figura 14. Valores de GSH en aorta en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2

mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. + diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 168 h. p < 0.05.

7.3.7. MDA

Los resultados de MDA en aorta no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos ni tiempos experimentales, como se observa en la figura 15.

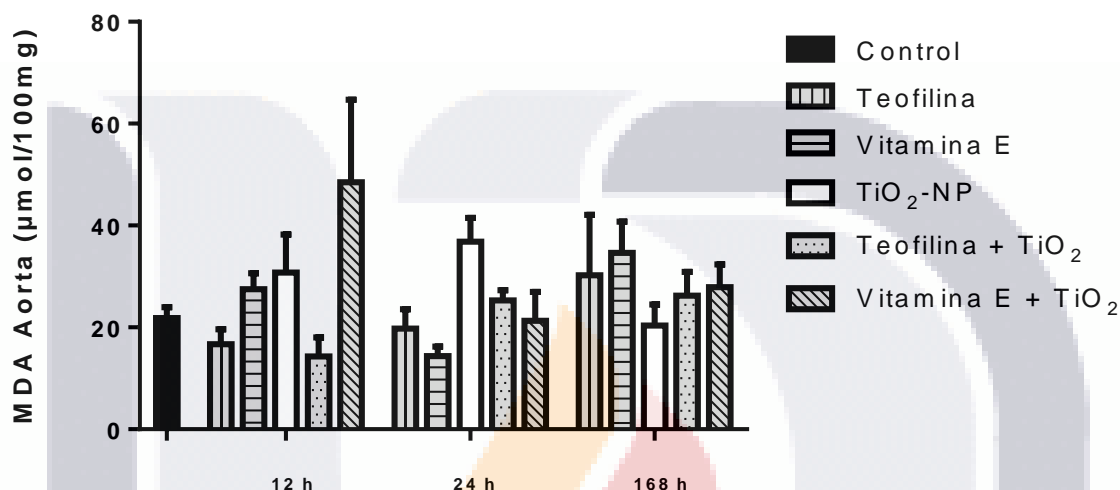


Figura 15. Valores de MDA en aorta en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg, ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE.

7.3.8. Lipoperóxidos

Los resultados de lipoperóxidos en aorta mostraron incremento significativo en los grupos vitamina E a las 12 y 168 h, TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h, y vitamina E + TiO₂-NP a las 24 y 168 h con respecto al grupo control; mientras que existe una disminución significativa en el grupo teofilina + TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h con respecto al grupo TiO₂-NP en los mismos tiempos experimentales. Todo esto se observa en la figura 16.

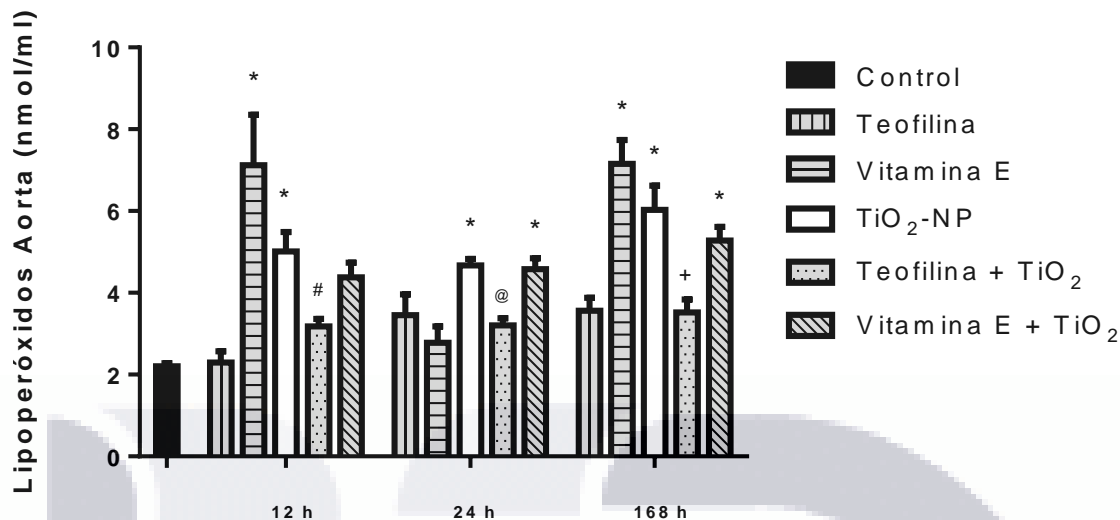


Figura 16. Valores de lipoperóxidos en aorta en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. # diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 12 h. @ diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 24 h. + diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 168 h. p < 0.05.

7.3.9. Carbonilos

Los resultados de carbonilos en aorta mostraron incremento significativo en los grupos TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h, vitamina E + TiO₂-NP a las 12 y 24 h, con respecto al grupo control; mientras tanto, los grupos teofilina + TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h, y vitamina E + TiO₂-NP a las 168 h, mostraron disminución significativa con respecto a los grupos TiO₂-NP en los respectivos tiempos experimentales, todo esto se muestra en la figura 17.

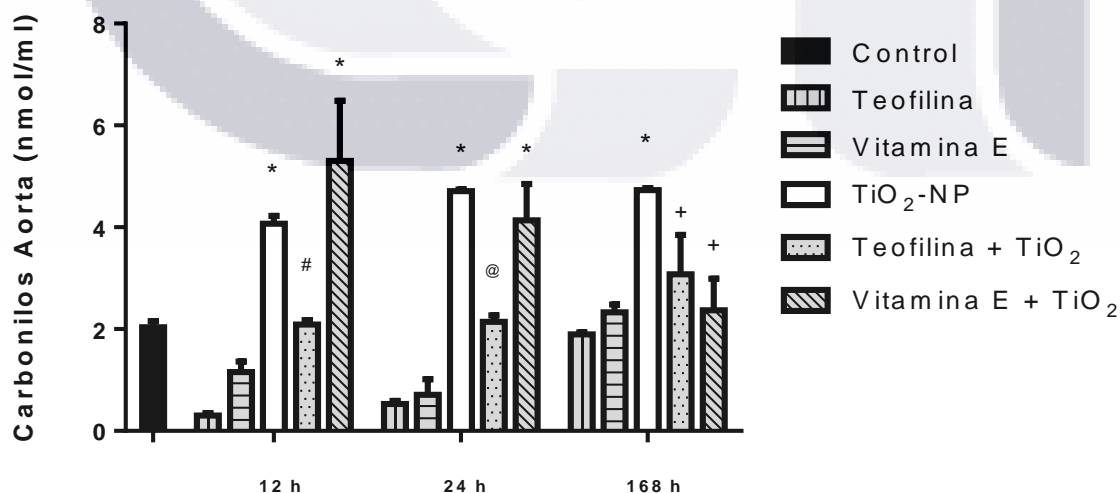


Figura 17. Valores de carbonilos en aorta en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina

+ TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. # diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 12 h. @ diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 24 h. + diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 168 h. p < 0.05.

7.4. Hígado

7.4.1. GSH

Los resultados de GSH en hígado mostraron disminución significativa con respecto a grupo control en los grupos vitamina E a las 12, 24 y 168 h, TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h, teofilina + TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h, y vitamina E + TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h. Todo esto se observa en la figura 18.

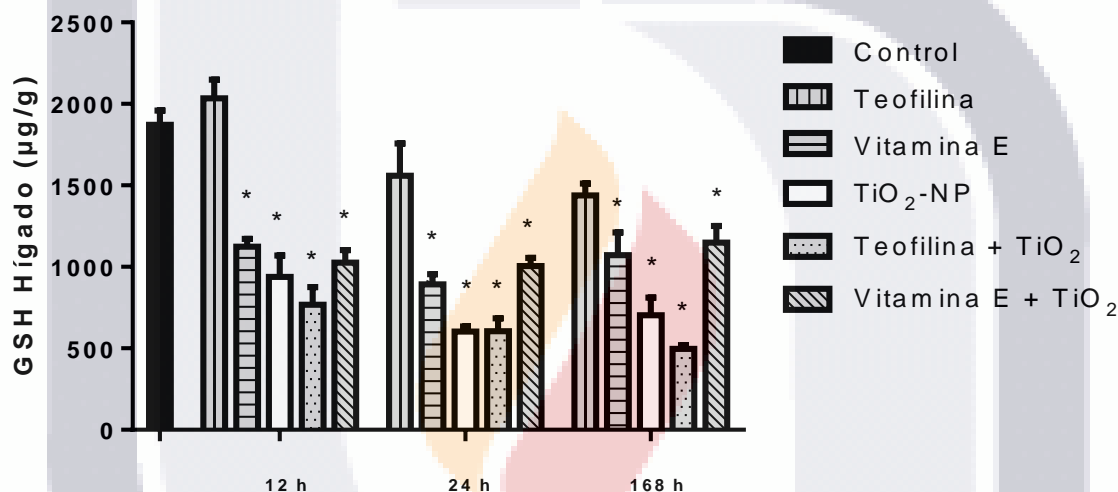


Figura 18. Valores de GSH en hígado en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg, ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. p < 0.05.

7.4.2. MDA

Los resultados de MDA en hígado no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos ni tiempos experimentales como se observa en la figura 19.

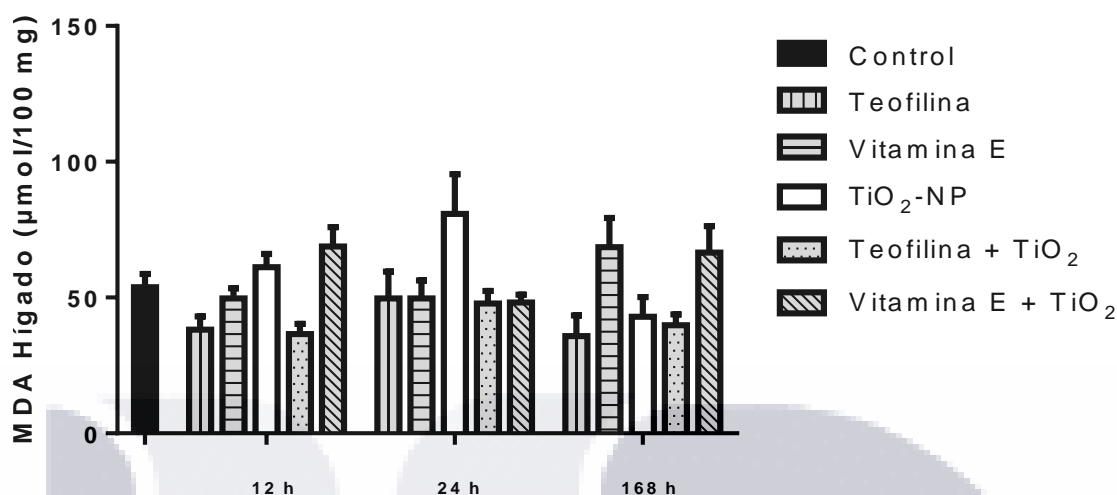


Figura 19. Valores de MDA en hígado en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE.

7.4.3. Lipoperóxidos

Los resultados de lipoperóxidos en hígado mostraron un incremento significativo en los grupos vitamina E (12 y 24 h) y TiO₂-NP a las 168 h con respecto al grupo control; mientras tanto, los grupos teofilina + TiO₂-NP y vitamina E + TiO₂-NP a las 168 h tuvieron una disminución significativa con respecto al grupo TiO₂-NP en el tiempo respectivo. Todo esto se observa en la figura 20.

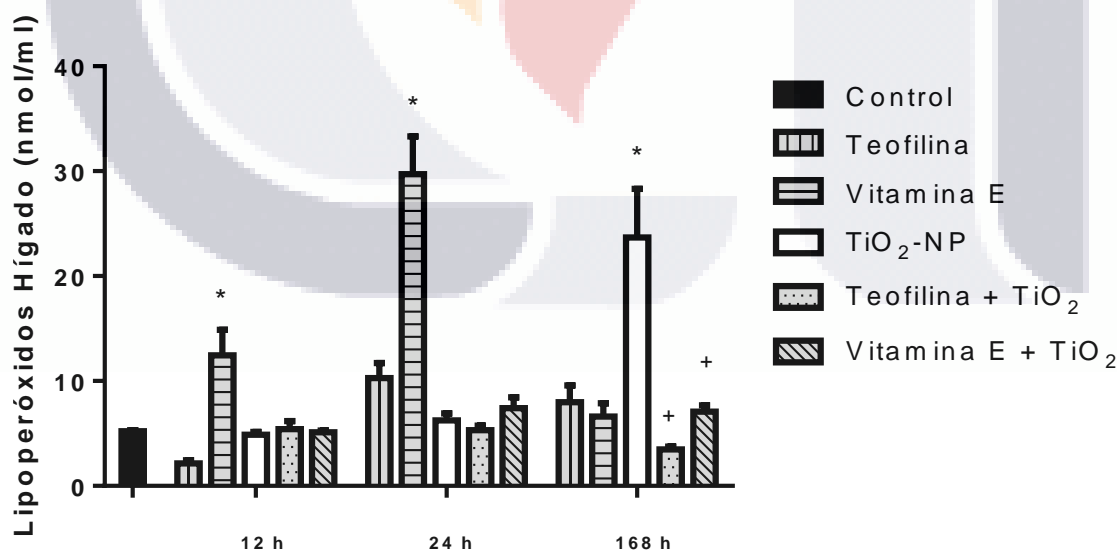


Figura 20. Valores de lipoperóxidos en hígado en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6.

Los resultados se expresan en media \pm EE. * diferencia significativa con respecto al control. + diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 168 h. p < 0.05.

7.4.4. Carbonilos

Los resultados de carbonilos en el hígado mostraron aumento significativo con respecto al grupo control en los grupos teofilina a las 12 y 24 h, y vitamina E a las 12 y 24 h, como se muestra en la figura 21.

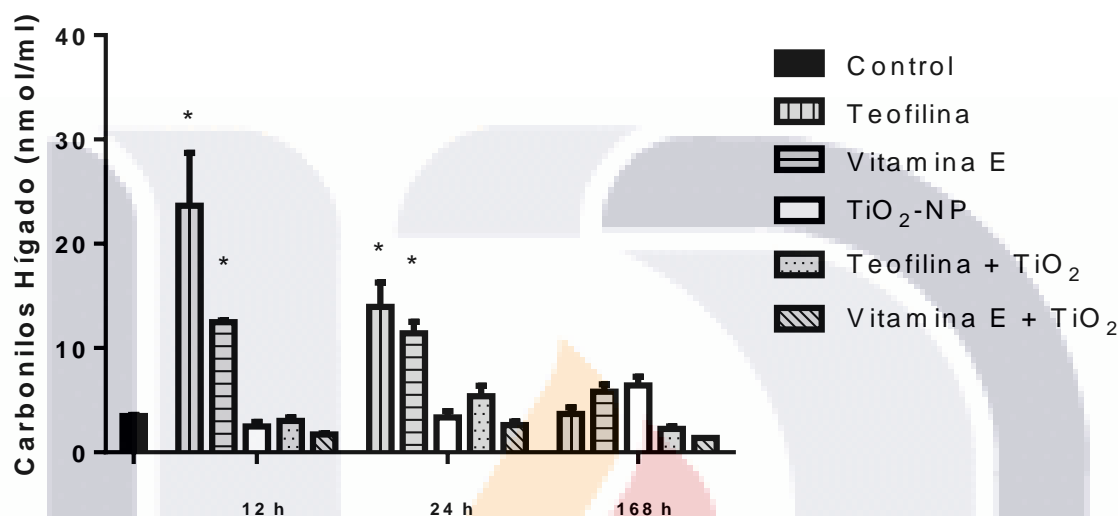


Figura 21. Valores de carbonilos en hígado en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg, ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media \pm EE. * diferencia significativa con respecto al control. p < 0.05.

7.4.5. Albúmina Plasmática

Los resultados de concentraciones plasmáticas de albúmina mostraron una disminución significativa con respecto al grupo control en los grupos teofilina a las 12 y 168 h, como se observa en la figura 22.

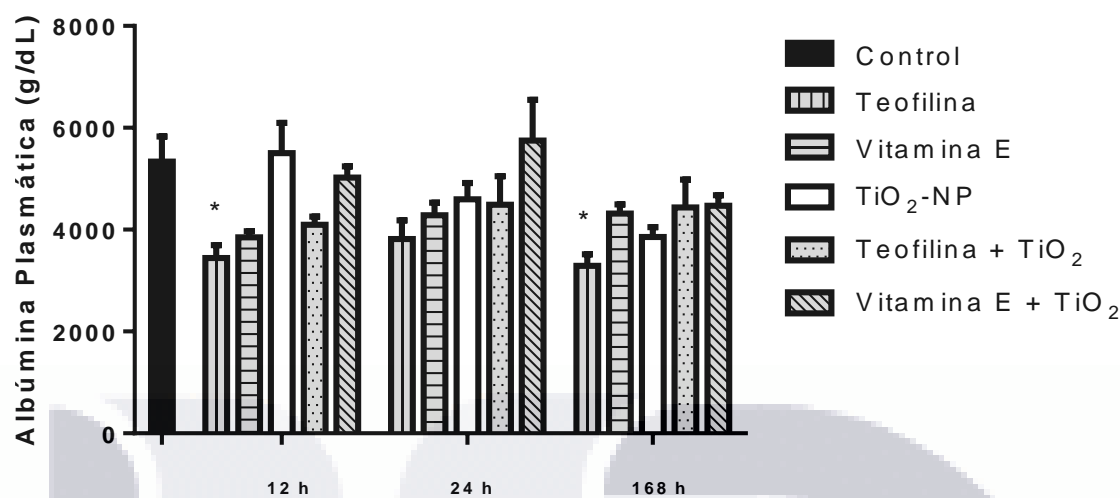


Figura 22. Valores de albúmina plasmática en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media ± EE. * diferencia significativa con respecto al control. p < 0.05.

7.4.6. TGO

Los resultados de TGO plasmático mostraron un incremento significativo en el grupo TiO₂-NP a las 12 h con respecto al grupo control, mientras tanto, el grupo vitamina E + TiO₂-NP a las 12 h mostró una disminución significativa con respecto al grupo TiO₂-NP a las 12 h. Todo esto se observa en la figura 23.

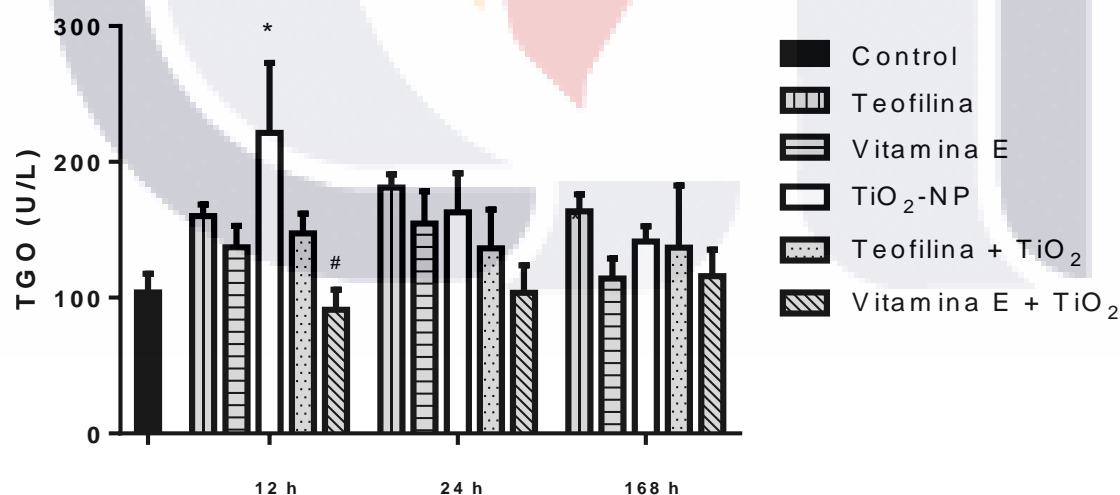


Figura 23. Valores de TGO en plasma en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg,ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6.

Los resultados se expresan en media \pm EE. * diferencia significativa con respecto al control. + diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 168 h. p < 0.05.

7.4.7. TGP

Los resultados de TGP en plasma mostraron incremento significativo con respecto al grupo control en los grupos vitamina E a las 12, 24 y 168 h, y en los grupos TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h. Mientras que los grupos vitamina E + TiO₂-NP a las 12, 24 y 168 h tuvieron una disminución significativa con respecto a los grupos TiO₂-NP en los respectivos tiempos experimentales. Todo esto se observa en la figura 24.

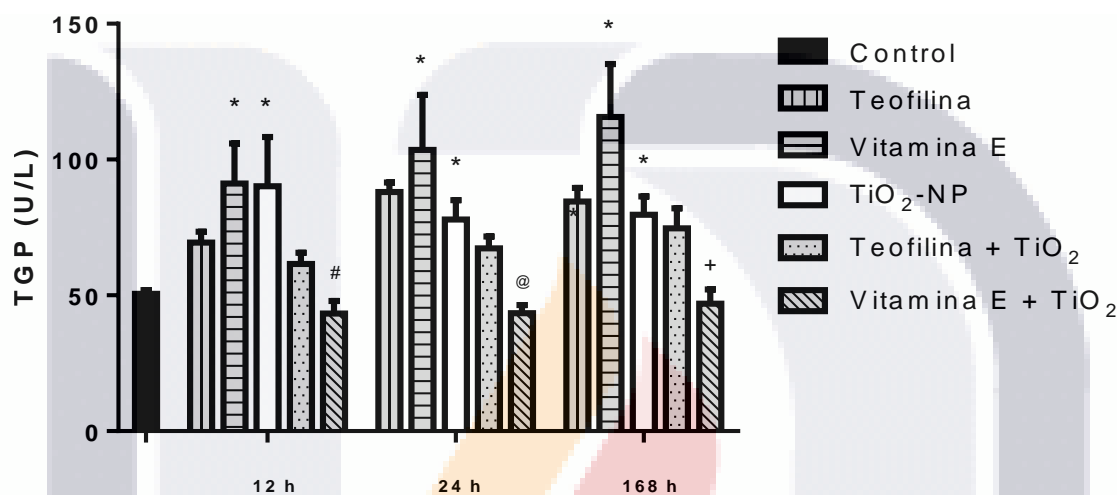


Figura 24. Valores de TGP en plasma en grupo control y a las 12, 24 y 168 h posterior al término del manejo correspondiente: Teofilina (2 mg/kg, ig) por 5 días; Vitamina E (4 mg/kg, ig) por 5 días; TiO₂-NP (5 mg/kg, iv); Teofilina + TiO₂-NP (2 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente); y Vitamina E + TiO₂-NP (4 mg/kg, ig por 5 días; más 5 mg/kg, iv; respectivamente). El análisis estadístico fue hecho con ANOVA y una prueba de Tukey con una n = 6. Los resultados se expresan en media \pm EE. * diferencia significativa con respecto al control. # diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 12 h. @ diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 24 h. + diferencia significativa con respecto al grupo TiO₂-NP 168 h. p < 0.05.

8. Discusión

El campo de los nanomateriales es cada vez más amplio, haciendo que no solo los trabajadores de empresas, sino que consumidores comunes estén en constante contacto con ellas (Aikens et al. 2006). Uno de estos materiales de mayor uso por sus propiedades únicas son las TiO₂-NP, las cuales, como se ha comentado anteriormente, son utilizadas para varios productos en diversas formas (Robichaud et al. 2009). Por lo comentado, es imprescindible dilucidar los efectos que estos nanomateriales pudiesen generar en el cuerpo humano, sobre todo, si estos efectos pueden llegar a ser dañinos (Manzoor et al. 2024). Si bien cada vez son más los trabajos que demuestran que las TiO₂-NP pueden generar efectos nocivos en diferentes órganos, es importante estudiar a fondo en qué condiciones generar su mayor toxicidad, si está relacionado a cierto grado de dosis, situaciones, preferencia por algún órgano específico del cuerpo, y además, es importante conocer maneras de amortiguar los efectos que se están encontrando. De esta manera no apartamos a los nanomateriales en la evolución

tecnológica o comercial, sino que, aprendemos de una mejor manera como trabajar con ellas y evitar circunstancias colaterales no deseadas.

En este trabajo, TiO_2 -NP fueron usadas para generar estrés oxidativo en los diferentes órganos de rata. La biodisponibilidad de TiO_2 -NP para su liberación, transporte, solubilidad y absorción depende de sus propiedades físicoquímicas relacionadas a su forma, tamaño, carga en la superficie y habilidad para aglomerarse (Baranowska-Wójcik et al. 2020). En el presente trabajo determinados el tamaño de TiO_2 -NP, su carga de superficie y la capacidad de aglomeración. Nuestro trabajo demostró que el cloruro de sodio (NaCl) en la solución es ionizada, y el sodio contribuye a la respuesta de las cargas positivas para la modificación del potencial Z, condicionando la capacidad de dispersión de las TiO_2 -NP. El grado de homogeneidad de las TiO_2 -NP en la solución es reflejada en el valor de PDI, estos valores reflejan que a al tiempo 0 el tamaño de TiO_2 -NP es más homogéneo que a los 5 min, estos son acorde con el valor del potencial Z y con lo encontrado en TEM (Bhattacharjee 2016). El análisis microscópico reveló que la formas de las TiO_2 -NP fue del tipo anatasa (octaedrita) y tenía un diámetro promedio de 40-60 nm, esta es la forma más pequeña de las TiO_2 -NP lo que les permite entrar al interior de las células. Asimismo, la forma anatasa fue congruente con la descripción reportada de TiO_2 -NP por Sigma-Aldrich (99.7%). La caracterización de TiO_2 -NP en este trabajo explica la biodisponibilidad en nuestro modelo y la instalación de estrés oxidativo en los órganos estudiados.

Varios estudios demostraron que la exposición a TiO_2 -NP produce estrés oxidativo y nitrativo en los distintos órganos (Cao et al. 2018). Existen biomarcadores que muestran el grado de estrés oxidativo y nitrativo, tales como lipoperóxidos totales, MDA, GSH y carbonilos.

MDA y lipoperóxidos totales, este último corresponden a MDA y HNE, son biomarcadores de peroxidación de lípidos (Estebauer et al. 1990).

No encontramos trabajos que se relacionen al incremento de esos biomarcadores en la tráquea como hicimos en este trabajo, los trabajos encontrados se relacionan al incremento de una respuesta inflamatoria a nivel pulmonar, ya sea por conteo de células inflamatorias como macrófagos y polimorfo nucleares (Rashad y Abdelwahab 2020) o bien, conteo de polimorfonucleares en un lavado traqueal (Oyabu et al. 2017). Nosotros relacionamos estos hallazgos con los nuestros a pesar de no haber manejado biomarcadores de inflamación, sino de estrés oxidativo; sin embargo, consideramos válida esta comparación, ya que existe una relación estrecha entre el estrés oxidativo y la generación de una respuesta inflamatoria, esta conexión está dada por el factor nuclear kappa beta ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) (Lawrence 2009). Así mismo, encontramos que existe un incremento en el tono basal de la tráquea en presencia de TiO_2 -NP, sin embargo, este incremento es atenuada cuando se dio profilaxis con un antioxidante, ya sea teofilina o vitamina E. En el trabajo de Sari et al. (2010) demostraron presencia de estrés oxidativo en la tráquea de rata posterior a una traqueostomía, la cual fue revertida utilizando vitamina E como agente antioxidante, lo cual concuerda con los resultados aquí expuesto. Además de un incremento de los lipoperóxidos totales. Llama la atención el incremento del GSH a nivel traqueal cuando solamente fue tratado de manera profiláctica con teofilina.

Nosotros encontramos que en presencia de un agente oxidativo como es TiO_2 -NP, la contracción de la muestra de aorta *In vitro* era mayor a las 12 h posterior a la intoxicación, sin embargo, fue más importante el incremento del tono basal frente al agente relajante, por lo que la problemática en este caso es la dificultad para relajarse en estas condiciones. La explicación que proponemos es que en presencia de un agente que genera especies reactivas de oxígeno en un sitio donde se encuentra el óxido nítrico (NO), principal agente relajante que se encuentra en el endotelio, se generan especies

reactivas de nitrógeno, ya que al interactuar el O_2^- con el NO se genera peroxinitrito ($ONOO^-$), molécula altamente reactiva para la generación de estrés nitrativo (Xu et al. 2024).

Spigoni et al. (2015) reportaron *in vitro* un incremento de MDA en células angiogénicas expuestas a TiO_2 -NP. Haberl et al. (2015) demostraron que la forma anatasa de TiO_2 -NP acelera significativamente la formación de trombos in la microcirculación con el uso de una dosis sistémica. Por otro lado, un efecto benéfico de diferentes antioxidantes en el sistema cardiovascular ha sido reportado contra la generación de estrés oxidativo por TiO_2 -NP. Hassanein y El-Amir (2017) demostraron el efecto antioxidante de timoquinona o avenantramidas en el corazón; Ding et al. (2016) Reportaron el efecto benéfico del ácido salvianólico B.

En nuestro trabajo las concentraciones de MDA no mostraron una diferencia significativa en los distintos grupos, pero hay una tendencia hacia la protección de teofilina contra la lipoperoxidación por TiO_2 -NP a las 12 y 24 h, y no a las 168 h, lo cual puede ser explicado por la media vida de la teofilina; mientras tanto, con la vitamina E se vio una tendencia a un efecto prooxidante a las 12 h y una antioxidante a las 24 h.

Los lipoperoxidos elevados (MDA y HNE) fueron encontrados en ratas tratadas con TiO_2 -NP en todos los tiempos experimentales, evidenciando daño al sistema membranal en células del tejido aórtico. Resultados similares fueron observados por Spigoni et al. (2015), cuando midieron MDA en células angiogénicas. Además, Wada et al. (2015) establecieron una asociación entre concentraciones mayores de HNE y disfunción cardiovascular. Zarkovic et al. Reportaron que HNE y MDA producen modificaciones funcionales y estructurales en las membranas celulares, lo cual lleva a una disminución en la elasticidad arterial y desarrollo de aterosclerosis, generando incremento en la PAS. El grupo que recibió teofilina + TiO_2 -NP disminuyó significativamente las concentraciones de lipoperoxidos con respecto al grupo tratado solo con TiO_2 -NP en todos los tiempos experimentales, sin embargo no lograron bajar los niveles hasta los encontrados en el grupo control, haciendo el efecto antioxidante evidente, el cual protege contra daño oxidativo en membranas celulares por TiO_2 -NP en tejido vascular, estos resultados pudieran ser importantes en las enfermedades cardiovasculares que comparten fisiopatología en base al estrés oxidativo. Mientras tanto, los resultados obtenidos con vitamina E mostraron que por si sola presenta un efecto prooxidante, y en presencia de un agente agresor, se comporta como un agente antioxidante.

En nuestro modelo, el grupo TiO_2 -NP presentó un incremento significativo de carbonilos en el homogenado de tejido aórtico comparado con el grupo control en todos los tiempos experimentales indicando el daño oxidativo en aorta afectando no solo los fosfolípidos de la membrana celular sino también las proteínas membranales y citosólicas. Algunos autores han ligado los niveles elevados de carbonilos con enfermedades cardiovasculares, incluyendo disfunción endotelial (Jo-Watanabe et al. 2015). El grupo teofilina presentó una disminución significativa en carbonilos comparado con el grupo control a las 12 y 24 h, sugiriendo una disminución en la oxidación proteica basal. El grupo de teofilina + TiO_2 -NP disminuyó significativamente los niveles de carbonilos con respecto al grupo TiO_2 -NP en todos los tiempos experimentales. Lo anterior demuestra que la teofilina tiene un efecto antioxidante que protege la oxidación de proteínas celulares en el tejido aórtico. Sin embargo, la teofilina no tuvo la misma reacción, ya que sola o en combinación de TiO_2 -NP, mostró una clara reacción prooxidante.

GSH es el principal antioxidante celular no enzimático, juega papeles críticos protegiendo células del daño oxidativo y de la toxicidad de xenobióticos electrofílicos; además de mantener la homeostasis oxido reducción (Forman et al. 2009). Un importante hallazgo en nuestro trabajo fue el incremento

significativo en la concentración de GSH en el tejido aórtico encontrado en el grupo teofilina a las 12 y 24 h después de la última administración, la cual es una dosis baja de 2mg/kg por 5 días. En este contexto, Aslam et al. (2022) reportaron cambios significativos en la disminución de estrés oxidativo y en el incremento de la vía de señalización Nrf2 relacionada a aterosclerosis en aorta de rata en grupos que recibieron *Opuntia ficus-indica* con respecto al control positivo, con ello demostrando el efecto de protector fitoquímico en tejido vascular. Las xantinas como cafeína, teofilina y teobromina son fitoquímicos que tienen una capacidad antioxidante a través de diferentes mecanismos, entre ellos, la activación del sistema Nrf2/keap1 que regula la expresión de enzimas relacionada a la síntesis de GSH (Kolb et al. 2021). Lo anterior puede explicar los niveles altos de GSH observados en este trabajo.

Similarmente, no hay diferencias significativas observadas en las concentraciones de GSH en los grupos TiO₂-NP y teofilina + TiO₂-NP a las 12 y 24 h comparadas al control. Una explicación posible para el mantenimiento de los niveles de GSH en el grupo TiO₂-NP a pesar de su consumo por las especies reactivas generadas es debido al control de la expresión de las enzimas glutamate-cysteine ligasa (GCL) y gamma glutamyl transpeptidasa (GGT), que participan en la síntesis de GSH, regulado a través de la vía Nrf2 activada por HNE (Forman et al. 2009). Consideramos que el efecto protector de teofilina en el tejido vascular, acoplado con el efecto inductor de la vía Nrf2 mediado por HNE, explica los niveles de GSH observados en el grupo teofilina + TiO₂-NP.

Con respecto a lo encontrado en el hígado posterior a la intoxicación con TiO₂-NP se mostraron niveles elevados de lipoperóxidos a los 168 h y de MDA a las 12 y 24 h. Recordando que el ensayo que el ensayo de lipoperóxidos mide MDA y HNE, por lo tanto, el HNE puede ser detectado de una manera indirecta si se tiene además los resultados de MDA. Presumiblemente, el HNE es más inestable y reactivo que MDA (Spickett et al. 2010). Nosotros encontramos estudios que mostraron incremento de MDA como en el nuestro, como Shakeel et al. (2016) y Jia et al. (2017); mientras tanto Pujalté et al. (2017) no tuvieron incremento en los niveles de la MDA; Hassanein y El-Amir (2016) tuvieron incremento en las concentraciones de lipoperóxidos, el cual se correlaciona con nosotros.

Nuestro estudio obtuvo una disminución del GSH hepático a las 12, 24 y 168 h posterior a la administración de TiO₂-NP, este resultado correlaciona con lo reportado en otros estudios (Sha et al. 2011; Hassanein y El-Amir 2016), pero lo reportado por Shakeel et al. (2016) fue lo contrario.

Los niveles de carbonilos en nuestro estudio tuvieron un incremento solamente posterior a las 168 h de la intoxicación con TiO₂-NP, este resultado correlaciona con lo visto en lipoperóxidos y MDA, por lo que podemos inferir que el HNE produjo oxidación de proteínas. Algunos autores han demostrado que el estrés oxidativo hepático puede incrementar la oxidación proteica y por ende la concentración de carbonilos (Cumaoglu et al. 2007; Li et al. 2015).

Las pruebas de enzimas hepáticas han sido usadas por muchos años como biomarcadores hepáticos (Huang et al. 2006) y los resultados en nuestro estudio después de la intoxicación con TiO₂-NP mostraron incremento de TGO y TGP, estos resultados correlacionan con otros autores que han obtenido alteraciones en las enzimas hepáticas posterior a la intoxicación con TiO₂-NP (Alarifi et al. 2013; Chang et al. 2015; Shakeel et al. 2016), mientras que Yang et al. (2017) no reportaron alteraciones en enzimas hepáticas, sin embargo ellos encontraron alteración en bilirrubinas y ácidos biliares.

La albúmina plasmática es un biomarcador de función hepática, el cual no solo está alterada en nuestro estudio posterior a la intoxicación con TiO₂-NP, esto se correlaciona con el trabajo de Elgrabli et al. (2015); Liu et al. (2009) donde se encontraron alteraciones con dosis altas (50, 100 y 150 mg/kg)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sino que no son las mismas dosis utilizadas por nosotros. Asimismo, podemos inferir que las TiO₂-NP pueden producir estrés oxidativo y daño, pero no altera la función hepática a las dosis usadas (5 mg/kg) y en los tiempos evaluados en este estudio; se necesita considerar que TiO₂-NP permanecen por largo tiempo dentro de hígado y el estrés oxidativo resultante puede desencadenar inflamación (Hong y Zhang 2016; Relier et al. 2017) y apoptosis (Alfarifi et al. 2013; Shukla et al. 2013; Thai et al. 2016; Yang et al. 2017).

En el estudio histopatológico fue observado efectos dañinos por intoxicación con TiO₂-NP, los cuales correlacionan con otros trabajos; Alarifi et al. (2013) encontraron vacuolas, degeneración hidrópica, inflamación y apoptosis; Chang et al. (2015) encontraron edema y citoplasma laxo; Hassanein y El-Amir (2016) encontraron infiltración mononuclear, degeneración vacuolar, dilatación de venas y necrosis; Jia et al. (2017) no encontraron alteraciones histopatológicas a una dosis de 5 mg/kg (la misma usada en este trabajo), pero a altas dosis encontraron obstrucción vascular y dilatación (50 mg/kg), basófilos incrementados (100 mg/kg), isquemia hepática (150 mg/kg) y obstrucción de la vena central.

La nanotecnología es un campo prometedor para la ciencia que necesita estrategias para minimizar los posibles efectos dañinos colaterales, por lo que diversos antioxidantes han sido estudiados como profilácticos para proteger el daño en el hígado por TiO₂-NP. Este estudio mostró que la vitamina E profiláctica no incrementó lipoperóxidos, pero MDA si incrementó a las 12 y 24 h, esto correlaciona con El-Shenawy et al. (2010); mientras tanto, De Lima-Sánchez et al. (2010) reportaron disminución en la concentración de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) usando vitamina E como protector contra el etanol; y Ohta et al. (2015) mostraron disminución en MDA usando vitamina E contra estrés por inmersión de agua. GSH fue disminuido debido a que la vitamina E requiere su oxidación para regenerar su función antioxidante (Van Meereten et al. 2015) y esto correlaciona con el trabajo de algunos autores (De Lima-Sánchez et al. 2010; Kaur et al. 2010; Ohta et al. 2015). En nuestro estudio la vitamina profiláctica + TiO₂-NP mantuvieron bajos los niveles de carbonilos en todos los tiempos experimentales, estos resultados correlacionan con otros autores (El-Shenawy et al. 2010; Venkata Subbaiah et al. 2015); TGO y TGP no tuvieron diferencias significativas comparadas con el grupo control, lo cual correlaciona con otros trabajos (De Lima-Sánchez et al. 2010; El-Shenawy et al. 2010; Lee et al. 2013); y la albumina plasmática no tuvo diferencia significativa comparada con el grupo control, esto correlaciona con Wilson Magdy et al. (2016). Estos resultados mostraron MDA incrementada pero no de lipoperóxidos, por lo que podemos inferir que la vitamina E profiláctica puede disminuir el daño bioquímico producido por TiO₂-NP debido a que el MDA es formado en lugar de HNE, la cual no es una molécula más reactiva que pueda dañar otras estructuras celulares (Spikett et al. 2010), esto explica porque todos los otros parámetros (GSH, carbonilos, TGO, TGP y albúmina plasmática) en este grupo en todos los tiempos experimentales no tuvieron alteraciones. Sin embargo, Nuestros resultados histopatológicos mostraron que la vitamina E profiláctica puede dañar el hígado, en estos casos, podríamos pensar que el MDA resultante está causando daño en la membrana celular y no en otras estructuras celulares al mismo tiempo. Las imágenes resultantes en el grupo vitamina E + TiO₂-NP son remarcables, ya que vimos una importante vacuolización que no está apoyada por los resultados bioquímicos, encontramos solamente incremento de MDA, esto puede decirnos que las membranas celulares son dañadas sin recuperación subsecuente en los tiempos experimentales evaluados. Se puede inferir que en las condiciones que la usamos, la vitamina E no es micronutriente que pudiera ser un protector inocuo contra la intoxicación por TiO₂-NP.

Todos las moléculas antioxidantes tienen el potencial para convertirse en moléculas prooxidantes (Carocho y Ferreira 2013), y la vitamina E no es la excepción, cuando los α -tocoferoles reaccionan

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con radicales libres de oxígeno, pueden convertirse en α -tocoferilos (Bruno y Traber 2006), por lo que esto apoya nuestros resultados cuando usamos vitamina E. Nuestros resultados mostraron incremento de lipoperóxidos a las 12 y 24 h donde MDA se incrementó a las 168 h, lo cual puede sugerir que el HNE es la moléculas principal resultante con la exposición de vitamina E, esto correlaciona con el incremento de las concentraciones de carbonilos a las 12 y 24 h. Las concentraciones de GSH fueron bajas en todos los tiempos experimentales, la concentración de TGO estuvo incrementada a las 24 h y nosotros no encontramos alteraciones en la albúmina plasmática. Afolabi et al. (2012) encontró resultados similares que nosotros con el MDA. Este efecto prooxidante puede ser causado por un incremento en las concentraciones de vitamina E dentro del organismo, pero no de la vitamina C, lo cual provoca un desbalance entre estos dos micronutrientes. Es sabido que el α -tocoferol tienen una cadena lateral saturada lo que le confiere a la molécula una alta liposolubilidad y esto le permite a la molécula quedarse en la membrana celular, incluso cuando se transforma en un radical α -tocoferil; la vitamina C es el principal micronutriente que regenera la actividad de los α -tocoferoles cuando se oxida (Bruno et al. 2006), por lo que podemos inferir que este desbalance produce el efecto prooxidante de la vitamina E, ya que se ha demostrado que la combinación entre estas dos vitaminas tienen un mejor efecto (Afolabi et al. 2012).

Una estrategia que pudiera evitar este efecto prooxidante es el uso de tocotrienoles en lugar de tocoferoles, ya que los tocotrienoles tienen una cadena lateral insaturada, lo cual les permite penetrar dentro de los tejidos que tienen ácidos grasos saturados como es el hígado (Suzuki et al. 1993; Ahsan et al. 2014), por lo que los efectos colaterales pudieran ser menor debido a que el tocotrienol oxidado puede ser depurado de la célula de una manera más sencilla que el tocoferol. Adicionalmente, algunos autores han reportado mejores efectos antioxidantes de tocotrienoles que de los tocoferoles (Adachi e Ishii 2000; Ahmad et al. 2005; Müller et al. 2010).

Mientras tanto, la terapia profiláctica con teofilina no mostró resultados mucho mejores que los presentados con la terapia profiláctica con vitamina E. Teofilina sola o bien, en el grupo combinado con TiO₂-NP, mostró un descenso de los niveles de GSH. Con respecto a los resultados tanto en MDA como en lipoperóxidos totales, no se encontraron diferencias significativas. Carbonilos se encuentran incrementados en presencia de teofilina. Las pruebas de función hepática, tales como albúmina sérica, TGO y TGP, no mostraron diferencias significativas con este fármaco. Poco se ha estudiado a la teofilina como agente antioxidante en el hígado, Moreau et al. (1992) lo utilizaron a dosis de 2-6 mg/kg para atenuar efectos dañinos en el hígado cirrótico con éxito moderado hemodinamicamente hablando. La situación para considerar es que el metabolismo de la teofilina es predominantemente hepático, por lo que su presencia en este órgano deriva rápidamente a su desintegración y conversión a otros metabolitos que pudieran tener menor actividad o incluso una actividad nula (Barnes 2010). Sin embargo, el papel como antioxidante de la teofilina es algo que continua en auge y que aún se sigue investigando, incluso en el tejido hepático (Jia et al. 2024).

9. Conclusiones

El campo de la nanotecnología es cada vez más amplia, más compleja y utilizada, por lo que su contacto es ya una situación cotidiana, tanto para trabajadores del campo como también para los consumidores y usuarios de los productos que lo contienen. Si bien, su uso se ha considerado en ocasiones como inocua, lo cierto es que existen diversos estudios en diversos órganos y tejidos que muestran resultados adversos que podrían desencadenar en cuestiones de salud importantes.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Es un hecho que la nanotecnología no se va a detener, pero si podemos encontrar estrategias para disminuir o evitar los diversos efectos colaterales a lo que nos exponen. Debido a que los estudios han estado enfocados al estrés oxidativo resultante, es lógico utilizar sustancias antioxidantes para contrarrestar los efectos. Los utilizados por nosotros es la vitamina E y la teofilina. La vitamina E es un antioxidante altamente estudiado por años, y del que se conocen muy bien sus efectos. Sin embargo, la teofilina es un fármaco que históricamente se ha utilizado con propósitos respiratorios. Nosotros hemos trabajado con una dosis mucho menor a la convencional para desencadenar sus efectos antioxidantes no tan estudiados hasta el día de hoy.

Los resultados obtenidos nos han mostrado que los antioxidantes a veces pueden convertirse en prooxidantes, esto puede depender de la dosis utilizada, del tejido y del órgano en cuestión, Por lo que son necesarios estudios posteriores para comprender el mecanismo de acción exacto de estas sustancias para un uso futuro con mayor probabilidad de éxito y menor rango de error.

10. Referencias

- Adachi H, Ishii N. (2000) Effects of tocotrienols on life span and protein carbonylation in *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol*. 55A(6): B280-B285.
- Aikens J, Dix TA (1991) Peroxyl radical initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem*. 266(23): 15091-15098.
- Aitken, R.J., Chaudhry, M.Q., Boxall, A.B., Hull, M. (2006). Manufacture and use of nanomaterials: Current status in the UK and global trends. *Occupational Medicine*, 56(5), 300–306.
- Afolabi AO, Olotu OO, Alagbonsi IA. (2012) Vitamin E and C alleviate the germ cell loss and oxidative stress in cryptorchidism when administered separately but not when combined in rats. *Pharmacology*. 2012: 843569.
- Ahmad NS, Khalid BAK, Luke DA, Ima Nirwana S. (2005) Tocotrienol offers better protection than tocopherol from free radical-induced damage of rat bone. *Clin Exp Pharmacol*. 32(9): 761-770.
- Ahsan H, Ahad A, Iqbal J, Siddiqui WA. (2014) Pharmacological potential of tocotrienols a review. *Nutr Metab*. 11(1): 52.
- Alarifi A, Ahad A, Iqbal J, Siddiqui WA. (2014) Pharmacological potential of tocotrienols a review. *Nutr Metab*. 11(1):52.
- Aslam N, Faisal MN, Khan JA, Majeed W. *Opuntia ficus indica* (L.) fruit extract alleviates oxidative stress through activation of dual oxidases and Keap1/Nrf2 signaling cascades in high-fat-diet associated atherosclerosis rats. *Toxicol Res (Camb)* 2022;11(6):920-930.
- Baranowska-Wójcik E, Sz wajgier D, Oleszczuk P, Winiarska-Mieczan A. Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health-a Review. *Biol Trace Elem Res* 2020;193(1):118-129. doi: 10.1007/s12011-019-01706-6
- Barnes P. (2003) Theophylline: New perspectives for an old drug. *Am J Respir Crit Care Med*. 167: 813-818.
- Barnes P. (2010) Theophylline. *Pharmaceuticals*. 3(3): 725-747.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Barrera G. (2012) Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*. doi: 10.5402/2012/137289

Bhattacharjee S (2015) Reactive oxygen species and cellular defense system. *Free Radicals in Human Health and Disease*. 17-25.

Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not. *J Control Release* 2016;235:337-351.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. (2012) Oxidative stress and antioxidant effect. *World Allergy Organ J*. 5(1): 9-19.

Brigelius-Frohé R, Traber MG (1999) Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 13: 1145-1155

Bruno RS, Traber MG. (2006) Vitamin E biokinetics, oxidative stress and cigarette smoking. *Pathology*. 13: 143-149.

Bruno RS, Leonard SW, Atkinson J, Montine TJ, Ramakrishnan R, Bray TM, Traber MG. (2006) Faster plasma vitamin E disappearance in smokers is normalized by vitamin C supplementation. *Free Radical Bio Med*. 40(4): 689-697.

Buzea C, Pacheco II, Robbie K (2007) Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2(4): 19-71. doi:10.3109/08958378.2012.697494

Cai Z, Yan LJ (2013) Protein oxidative modifications: beneficial roles in disease and health. *J Biochem Pharmacol Res*. 1(1): 15-26.

Cao Y, Gong Y, Liao W, Luo Y, Wu C, Wang M, Yang Q. A review of cardiovascular toxicity of TiO₂, ZnO and Ag nanoparticles (NPs). *Biomaterials* 2018;31(4):457-476

Carp O, Huisman CL, Reller A. (2004) Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Prog in Solid State Chem*. 32: 33-117.

Carocho M, Ferreira ICFR. (2013) A review of antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*. 51: 15-25.

Chang X, Xie Y, Wu J, Tang M, Wang B. (2015) Toxicological characteristics of titanium dioxide nanoparticles in rats. *J Nanosci Nanotechnol*. 15(2): 1135-1142.

Chen H, Zhen Z, Todd T, Chu PK, Xie J (2013) Nanoparticles for improving cancer diagnosis. *Mater Sci Eng R Rep* 74(3): 35-69. doi:10.1016/j.mser.2013.03.001

Choi, H.S., Ashitate, Y., Lee, J.H., Kim, S.H., Matsui, A., Insin, N., Bawendi, M.G., Semmler-Behnke, M., Frangioni, J.V., Tsuda, A. (2010). Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nature Biotechnology*, 28(12), 1300–1303.

Chorostowska-Wynimko J, Kus J, Skopinska-Rozewska E. (2007) Theophylline inhibits free oxygen radicals production by human monocytes via phosphodiesterase inhibition. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 58(5): 95-103.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Cui Y, Liu H, Zhou M, Duan Y, Li N, Gong X, Hu R, Hong M, Hong F. (2011) Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO₂ nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* 96(1):221-9.

Cumaoglu A, Cevik C, Rackova L, Ari N, Karasu C. (2007) Effects of antioxidant stobadine on protein carbonylation, advanced oxidation protein products and reductive capacity of liver in streptozocin-diabetic rats: role of oxidative/nitrosative stress. *Biofactors*. 30(3): 171-178.

De Lima-Sanches SC, Vannucchi-Portari G, Deminice R, Zucoloto S, Garcia-Chiarello P, Vannucchi H, Jordau A. (2010) Effects of lecitin and vitamin E supplementation on liver steatosis and oxidative stress induced by chronic ethanol consumption in rats. *Scand J Lab Anim Sci*. 37(3): 203-210.

Diaz-Acosta AE, Membrillo-Hernández J. (2006) Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Tip rev espec cienc quim-biol* 9(1): 34-44.

Ding L, Li J, Huang R, Liu Z, Li C, Yao S, Wang J, Qi D, Li N, Pi J. Salvianolic acid B protects against myocardial damage caused by nanocarrier TiO₂; and synergistic antibreast carcinoma effect with curcumin via codelivery system of folic acid-targeted and polyethylene glycol-modified TiO₂ nanoparticles. *Int J Nanomed* 2016;11:5709-5727.

Dogru B. (2003) Vitamin E as an antioxidant. *J Fac Pharm Ankara*. 32(4): 243-267.

Doumas BT, Watson WA, Biggs HG (1971) Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 31: 87-96.

El-Shenawy NS, El-Salmy F, Al-Eisa R, El-Ahmary B (2010) Amelioratory effect of vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon-induced oxidative stress in mice liver. *Pestic Biochem Phys* 96: 101-107. doi:10.1016/j.pestbp.2009.09.008

Elgrabli D, Beaudouin R, Jbilou N, Floriani M, Pery A, Rogerieux F, Lacroix G (2015) Biodistribution and clearance of TiO₂ nanoparticles in rats after intravenous injection. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0124490

Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hidroxyonenal. *Method Enzymol* 186: 407-408

Evans HM, Bishop KS (1922) On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 56: 60-61

Evans D, Taylor D, Zetterstrom O, Chung K. (1997) A comparison lo low-dose inhaled budesonide plus theophylline and high-dose inhaled budesonide for moderate asthma. *N Eng J Med*. 337(2): 1412-1418.

Eydner M, Schaudien D, Creutzenberg O, Ernst H, Hansen T, Baumgärtner W, Rittinghausen S (2012) Impact after inhalation of nano- and fine-sized titanium dioxide particles: morphological changes, translocation within the rat lung, and evaluation of particle deposition using the relative deposition index. *Inhal Toxicol* 24(9): 557-569

Ezeamuziel C. (2001) Involvement of A(3) receptors in the potentiation by adenosine of the inhibitory effects of theophylline on human eosinophil degranulation: possible novel mechanism of the anti-inflammatory action of theophylline. *Biochem Pharmacol.* 61(12): 1551-1559.

Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, Van Ravenzwaay B (2008) Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch Toxicol* 82: 151-157. doi 10.1007/s00204-007-0253-y

Farbstein D, Kozak-Blickstein A, Levy A. (2010) Antioxidants vitamins and their use in preventing cardiovascular disease. *Molecules.* 15.

Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 2009;30(1-2):1-12.

Geraets L, Oomen AG, Krystek P, Jacobsen NR, Wallin H, Laurentie M, Verharen HW, Brandon EFA, De Jong WH (2014) Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol* 11(30): 1-21

Gonzalez-Esquivel, A, Charles-Niño C, Pacheco-Moises F, Ortiz G, Jaramillo-Juarez F, Rincon-Sanchez A. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress in liver and kidney induced by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in rats. *Toxicol Mech Methods.* 2015 Mar;25(3):166-75.

Gui S, Li B, Zhao X, Sheng L, Hong J, Yu X, Sang X, Sun Q, Ze Y, Wang L, Hong F. Renal injury and Nrf2 modulation in mouse kidney following chronic exposure to TiO₂ nanoparticles. *J Agric Food Chem* 61. 2013: 8959-8968.

Gupta SM, Tripathi M. (2010) A review of TiO₂ nanoparticles. *Chinese Sci Bull.* 56(16): 1636-1657.

Haberl N, Hirn S, Holzer M, Zuchtriegel G, Rehberg M, Krombach F. Effects of acute systemic administration of TiO₂, ZnO, SiO₂, and Ag nanoparticles on hemodynamics, hemostasis and leukocyte recruitment. *Nanotoxicology* 2015;9:963–971.

Hagens WI, Oomen AG, De Jong WH, Cassee FR, Sips AJAM (2007) What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?. *Regul Toxicol Pharm* 49: 217-229. doi:10.1016/j.yrtph.2007.07.006

Halliwell B, Gutteridge JMC. (1990) Role of free and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85.

Hassanein KM, El-Amir YO. Protective effects of thymoquinone and avenanthramides on titanium dioxide nanoparticles induced toxicity in Sprague-Dawley rats. *Pathol Res Pract* 2017;213:13–22.

Hendeles L, Massanari M, Weinberger M. (1985) Update on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of theophylline. *Chest.* 88: 103-111.

Henderson-Smart D, Steer P. (2010) Caffeine versus theophylline for apnea in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 20(1): 273.

Hissin P, Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74: 214-226.

Hong J, Zhang YQ. (2016) Murine liver damage caused by exposure to nano-titanium dioxide. *Nanotechnology*. 27(11): 112001.

Huang XJ, Choi YQ, Im HS, Yarimaga O, Yoon E, Kim HS. (2006) Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors*. 6(7): 756-782.

Jawad H, Boccaccini AR, Ali NN, Harding SE. Assesment of celular toxicity of TiO₂ nanoparticles for cardiac tissue engineering applications. *Nanotoxicology*. 2011 Sep;5(3):372-80.

Jena NR (2012) DNA damage by reactive species: mechanism, mutation and repair. *J Biosci*. 37(3): 503-517.

Jia X, Wang S, Zhou L, Sun L. (2017) The potential liver, brain and embryo toxicity of titanium dioxide nanoparticles on mice. *Nanoscale Res Lett*. 12:478.

Jia X, Yang D, Wang W, Hu K, Yan M, Zhang L, Gao L, Lu Y. (2024) Recent advances in pharmaceutical cocrystals of theophylline. *J Nat Prod*. 14(53): 1-16.

Jo-Watanabe A, Ohse T, Nishimatsu H, Takahashi M, Ikeda Y, Wada T, et al. Glyoxalase I reduces glycative and oxidative stress and prevents age-related endothelial dysfunction through modulation of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Aging Cell* 2015;13(3):519-528.

Kaur J, Shalini S, Bansal MP. (2010) Influence of vitamin E on alcohol-induced changes in antioxidants defenses in mice liver. *Toxicol Mech Method*. 20(2): 82-89.

Kawiecien S, Jasnos K, Magierowski M, Siwowski Z, Pajdo R, Brzozowski B, Mach T, Wojcik D, Brzozowski T. (2014) Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress – induced gastric injury. *J Physiol Pharmacol*. 65(5): 613-622.

Kaya N. (2009) Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Molecular Vision*. 15: 855-860.

Kolb H, Martin S, Kempf K. (2021) Coffee and lower risk of type 2 diabetes: arguments for a causal relationship. *Nutients* 13:1144.

Kongseng S, Yoovathaworn K, Wongprasert K, Chunhabundit R, Sukwong P, Pissuwwan D. Cytotoxic and inflammatory responses of TiO₂ nanoparticles on human peropheral blood mononuclear cell. *J Appl Toxicol*. 2016 Oct;36(10):1364-73.

Krawczyk M, Stanis E (2016) Ultrasound-assisted dispersive micro solid-phase extraction with nano-TiO₂ as adsorbent for the determination of mercury species. *Talanta*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.071>

Kreyling WG, Holzwarth U, Haberl N, Kozempel J, Hirn S et al (2017) Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intravenous injection in rats (Part 1). *Nanotoxicology*. doi:10.1080/17435390.2017.1306892

Kreyling WG, Holzwarth U, Schleh C, Kozempel J, Wenk A et al (2017) Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats (Part 2). *Nanotoxicology*. doi:10.1080/17435390.2017.1306893

Kreyling WG, Holzwarth U, Haberl N, Kozempel J, Wenk A et al (2017) Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intratracheal instillation in rats (Part 3). *Nanotoxicology*. doi:10.1080/17435390.2017.1306894

Lapenna D, De Gioia S, Mezetti A, Ciofani G, Festi D, Cuccurullo F. Aminophylline: could it act as an antioxidant *in vivo*?. *European Journal of Clinical Investigation*. 25: 464-470.

Lawrence T (2009) The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold spring Harb Perspect Biol* 1(6): a001651.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I et al (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method Enzymol* 186: 464-478

Li N, Duan Y, Hong M, Zheng L, Fei M et al (2010) Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol Lett* 195: 161-168. doi:10.1016/j.toxlet.2010.03.1116

Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. (2015) The role of oxidative stress antioxidants in liver disease. *Int J Mol Sci*. 16(11): 26087-26124.

Liu H, Ma L, Zhao J, Liu J, Tan J, Ruan J, Hong F. (2009) Biochemical toxicity of nano-anatase TiO₂ particles in mice. *Biol Trace Elem Res*. 129(1-3): 170-180.

Ma L, Zhao J, Wang J, Liu J, Duan Y, Liu H, Li N, Yan J, Ruan J, Wang H, Hongo F. The acute liver injury in mice caused by nano-anatase TiO₂. *Nanoscale Res Lett*. 2009 Aug 1;4(11):1275-85.

Ma L, Liu J, Li N, Wang J, Duan Y, Yan J, Liu H, Wang H, Hong F (2010) Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials* 31: 99-105. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.028

Manzoor Q, Sajid A, Ali Z, Nazir A, Sajid A, Imtiaz F, Iqbal S, Younas U, Aif H, Iqbal M. (2024) Toxicity spectrum and detrimental effects of titanium dioxide nanoparticles as an emerging pollutant: A review. *Deal Water Treat* 317.

Meena R, Rani M, Pal R, Rajamani P (2012) Nano-TiO₂-induced apoptosis by oxidative stress-mediated DNA damage and activation of p53 in human embryonic kidney cells. *Appl Biochem Biotechnol* 167: 791-808. doi:10.1007/s12010-012-9699-3

Meena R, Kajal K, Paulraj R. Cytotoxic and genotoxic effects of titanium dioxide nanoparticles in testicular cells of male Wistar rat. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015 Jan;175(2):825-40.

Miller ER III, Pastor-Barrluso R, Dalal D, Rlemersma RA, Appel LJ, Guallar E (2005) Meta-analysis: high dosage vitamin e supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 142: 37-46.

Moreau R, Champigneulle B, Gaudin C, Poo Jorge Luis, Kleber G, Bacq Y, Lebrec D. (1992) Effects of theophylline on hemodynamics and tissue oxygenation in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 15(3): 323-329.

Morita Y, Nishida Y, Kamatani N, Myamoto T. (1984) Theophylline increases serum acid uric levels. *J Allergy Clin Immunol*. 75(5): 707-712.

Müller L, Theile K, Böhm V. (2010) *In vitro* antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Mol Nutr Foos Res.* 54(5): 731-742.

Niki E (1987) Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44: 227-253.

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005) Nanotoxicology: An emerging discipline involving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Persp* 13(7): 823-839.

Ohta Y, Yashiro K, Ohashi K, Horikoshi Y, Kusumoto C, Matsura T, Fukuzawa K. (2015) Effects of dietary vitamin E supplementation on liver oxidative damage in rats with water-immersion restrain stress. *J Nutr Sci Vitaminol.* 61(2): 113-122.

Oyabu T, Myojo T, Lee BW, Okada T, Izumi H, Yoshiura Y, Tomonaga T, Li YS, Kawai K, Shimada M, Kubo M, Yamamoto K, Kawaguchi K, Sasaki T, Morimoto Y (2017) Biopersistence of NiO and TiO₂ nanoparticles following intratracheal instillation and inhalation. *Int J Mol Sci* 18(12): 2752.

Ponczek MB, Wachowicz B (2005) Interactions of reactive oxygen and nitrogen species with proteins. *Postepy Biochem.* 51(2): 140-145.

Pujalté I, Dieme D, Haddad S, Serventi AM, Bouchard M. (2017) Toxicokinetics of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles after inhalation in rats. *Toxicol Lett.* 265: 77-85.

Rashad WA, Abdelwahab OA (2021) Toxic effect of titanium dioxide nanoparticles on the lung of adult male albino rat and possible protective role of β -carotene: light and electron microscopy study. *Egypt J Histol* 44(2): 425-435.

Relier C, Dubreuil M, Lozano-Garcia O, Cordelli E, Mejia J, Eleuteri P, Robidel F, Loret T, Pacchierotti F, Lucas S, et al. (2017) Study of TiO₂ P25 nanoparticles genotoxicity on lung, blood and liver cells in lung overload and non-overload conditions after repeated respiratory exposure in rats. *Toxicol Sci.* 156(2): 527-537.

Robichaud CO, Uyar AE, Darby MR, Zucker LG, Wiesner MR. (2009) Estimates of upper bound and trends in nano-TiO₂ production as a basis of assessment. *Environmental Science & Technology.* 43: 4227-4233.

Sang X, Zheng L, Sun Q, Li N, Cui Y et al (2012) The chronic spleen injury of mice following long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res* 100(4): 894-902. doi: 10.1002/jbm.a.34024

Santos P, Silva S, Justino G, Vieira A. (2010) Demethylation of the theophylline (1,3-dimethylxanthine) to 1-methylxanthine: the first step of a antioxidising cascade. *Redox Report.* 15(3): 138-144.

Sari M, Yacizi ZM, Özdemir N, Yanik M, Üneri C. (2010) The effect of vitamin E-coated tracheotomy cannula on tracheal reactive oxygen species. *Balkan Med J* 27(2): 178-182.

Savi M, Rossi S, Bocchi L, Gennaccaro L, Cacciani F, Perotti A, Amidani D, Alinovi R, Goldoni M, Aliatis I, Lottici PP, Bersani D, Campanini M, Pinelli S, Petyx M, Frati C, Gervasi A, Urbanek K, Quaini F, Buschini A, Stilli D, Rivetti C, Macchi E, Mutti A, Miragoli M, Zaniboni M. Titanium dioxide nanoparticles promote arrhythmias via a direct interaction with rat cardiac tissue. *Part Fibre Toxicol.* 2014 Dec 9;11:63.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Senzui, M., Tamura, T., Miura, K., Ikarashi, Y., Watanabe, Y., Fujii, M. (2010). Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle into intact and damaged skin in vitro. *The Journal of Toxicological Sciences*, 35(1), 107-113.

Seiler HG. A handbook of toxicity of inorganic compounds. (1988) Ed. Allison-Wesley. 34-39 pp.

Singh U, Devaraj S, Jialal I (2005) Vitamin e, oxidative stress, and inflammation. *Annu Rev Nutr* 25: 151-174. doi:10.1146/annurev.nutr.24.012003.132446

Sha BY, Gao W, Wang SQ, Xu F, Lu TJ. (2011) Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles differs in four liver cell from human and rat. *Composites: Part B*. 42:2136-2144.

Shakeel M, Jabeen F, Qureshi NA, Fakhr-e-Alam M. (2016) Toxic effects of titanium dioxide nanoparticles and titanium dioxide bulk salt in the liver and blood of male sprague-dawley rats assessed by different assays. *Biol Trace Elem Res*. 173(2): 405-426.

Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. (2013) Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*. 10(15): 1-33.

Shukla RK, Kumar A, Gurdani D, Pandey AK, Singh S, Dhawan A. (2013) TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. *Nanotoxicology*. 7(1): 48-60.

Skocaj, M., Filipic, M., Petkovic, J., Novak, S. (2011). Titanium dioxide in our everyday life; is it safe?. *Radiology and Oncology*, 45(4), 227–247.

Spickett CM, Wiswedel I, Siems W, Zarkovic K, Zarkovic N. (2010) Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. *Free Radical Res*, 44(10): 1171-1202.

Spigoni V, Cito M, Alinovi R, Pinelli S, Passeri G, Zavaroni I, et al. Effects of TiO₂ and Co₃O₄ nanoparticles on circulating angiogenic cells. *PLoS One* 2015;10(3):e0119310.

Starvridis JC (2008) Oxidative stress. Oxidation- the cornerstone of carcinogenesis. *Springer*. (Cap.2, pp. 31-48).

Sunil Paul M, Aravind U, Pramod G, Saha A, Aravindakumar T. (2014) Hydroxyl radical induced oxidation of theophylline in water: a kinetic and mechanistic study. *Org Biomol Chem*. 12: 5611-5620.

Suzuki YJ, Tsuchiya M, Wassal SR, Choo YM, Govil G, Kagan VE, Packer L. (1993) Structural and dynamic membrane properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry*. 32(40): 10692-10699.

Tedja R, Lim M, Amal R, Marquis C (2012) Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. *ACS Nano* 6(5): 4083-4093

Tenorio FA, Del Valle L, Pastelín G. (2005) Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables del óxido nítrico en fluidos biológicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 36(1): 31-41.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Thai SF, Wallace KA, Jones CP, Ren H, Grulke E, Castellon BT, Crooks J, Kitchin KT. (2016) Differential genomic effects of six different TiO₂ nanomaterials on human liver HepG2 cells. *J Biochem Mol Toxic.* 30(7): 331-341.

Tietz NW (1995) Clinical guide to laboratory test. WB Saunders, Philadelphia, PA, USA.

Van Meereten ME, Teunissen CE, Dijkstra CD, Van Tol EAF. (2005) Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Eur J Clin Nutr.* 59(12): 1347-1361.

Venkata Subbaiah KC, Valluru L, Rajendra W, Ramamurthy C, Thirunavukkarasu C, Subramanyam R (2015) Newcastle disease virus (NDV) induces protein oxidation and nitration in brain and liver of chicken: ameliorative effect of vitamin e. *Int J Biochem Cell B* 64: 97-106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.03.019>

Wada S, Sugioka K, Naruto T, Kato Y, Shibata T, Inoue T., et al. Relationship between oxidative stress and aortic valve stenosis in humans: an immunohistochemical study. *Osaka City Med J* 2015;59(2):61-67

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

Wilson Magdy B, El-Sayed MF, Seelem AA, Sarhan RS. (2016) Ameliorative effect of antioxidants (vitamin C and E) against abamectin toxicity in liver, kidney and testis of male albino rats. *JOBAS.* 77: 69-82.

Xu S, Han H, Wang X, Yu Y, Qu C, Liu X, Yang B. (2024) The role of oxidative stress in aortic dissection: a potential therapeutic target. *Front Cardiovasc Med* 11:1410477.

Yang J, Luo M, Tan Z, Dai M, Xie M, Lin J, Hua H, Ma Q, Zhao J, Liu A (2017) Oral administration of nano-titanium dioxide particle disrupts hepatic metabolic functions in a mouse model. *Environ Toxicol Phar* 49: 112-118.

Zarkovic K, Larroque-Cardoso P, Pucelle M, Salvayre R, Waeg G, Negre-Salvayre A, Zarkovic N. Elastin aging and lipid peroxidation products in human aorta. *Redox Biol* 2015;4:109–117.