



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD
INDUCIDA POR SISTEMAS
NANOPARTICULADOS DE SiO_2 /PECA EN
SISTEMAS *in vivo*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

CANUDAS VIDAL CARLA MARIANA

ASESOR: DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA

COASESOR: DR. ROBERTO DÍAZ TORRES

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
SUPERIORES CUAUTITLÁN

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS

Evaluación de la citotoxicidad inducida por sistemas nanoparticulados de SiO₂/PECA en sistemas in vivo

Que presenta la pasante: Carla Mariana Canudas Vidal

Con número de cuenta: 304850222 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de abril de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|--------------|---------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | DAR. Juan José Díaz Esquivel | |
| VOCAL | QFB. Gabriela Escalante Reynoso | |
| SECRETARIO | Dra. Patricia Ramírez Noguera | |
| 1er SUPLENTE | MI. Claudia Mariano Hernández | |
| 2do SUPLENTE | QFB. Adriana Gil García | |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

Agradecimientos y Dedicatorias

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y a los docentes que me transmitieron sus conocimientos, experiencia y pasión por mi carrera en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; por las vivencias que marcaron toda una etapa en mi vida inolvidable.

A mí, por concluir este proyecto que dará inicio a un nuevo ciclo, con más metas y objetivos.

Gracias a ti por la vida que me has dado, por cada momento de felicidad y experiencia, porque siempre estás ahí cuidándome y guiando mi camino...

A mi familia, gracias por todo el amor, apoyo incondicional... a mi papá por la base sólida que nos ha dado inculcándome los valores de responsabilidad y respeto; a mi mamá por ser ese pilar fuerte que nos mantiene de pie, da estabilidad, protección y cariño constante y a ambos por alentarme a exigirme y hacerme ver que siempre puedo dar más de mí. A Sofía, gracias por estar ahí en todo momento, eres mi mejor amiga, confidente y cómplice. A Brendita, por retarme encontrar mi lado tolerante y comprensivo, enseñarme que cada persona es diferente y nada es sencillo. Cada logro siempre se los voy a dedicar, porque sin ustedes no sería nada de lo que soy ahorita. A mis abuelos, tíos y primos por el ejemplo y consejos que me han dado; gracias por su motivación.

A la Dra. Patricia Ramírez y el Dr. Roberto Díaz, gracias por su apoyo, paciencia y orientación, por mostrar siempre disposición ante mi proyecto final, gracias por compartir sus experiencias y vivencias, son personas admirables no sólo en el lado intelectual, si no como amigos.

A mis amigos que lejos, cerca, siempre están ahí y a todas las personas que de alguna forma han influido en mi vida y me han enseñado algo.

A mis coaches que al transmitirme su pasión por el deporte me enseñaron la importancia del trabajo en equipo y la actitud perseverante.

Al proyecto PAPIME PE202410 por su apoyo.

Al técnico Rodolfo Robles por las Micrografías de Barrido para este trabajo en el Laboratorio de Microscopía en la FESC – 1.

A la Dra. Elizabeth García por facilitarnos la determinación de tamaño de partícula y potencial Z que se utilizaron para caracterización de los sistemas nanoparticulados.

Índice General

| | |
|---|-----------|
| Agradecimientos y Dedicatorias | 3 |
| Índice General | 4 |
| Índice de figuras | 6 |
| Índice de tablas | 8 |
| Tabla de abreviaturas | 9 |
| 1 Introducción | 10 |
| 2 Marco teórico..... | 13 |
| 2.1 Nanotecnología..... | 13 |
| 2.2 Historia de las Nanopartículas | 13 |
| 2.3 Definición de Nanopartículas..... | 15 |
| 2.4 Métodos de preparación de Nanopartículas | 15 |
| 2.5 Nanopartículas de Polialquil cianoacrilato | 16 |
| 2.6 Purificación de Nanopartículas | 18 |
| 2.7 Caracterización de Nanopartículas | 18 |
| 2.7.1 Técnicas empleadas para la caracterización de sistemas nanoparticulados..... | 19 |
| 2.7.1.1 Tamaño de partícula..... | 19 |
| 2.7.1.1.1 Espectroscopía de correlación de fotones “PCS” (Photon Correlation Spectroscopy) o Dispersión Dinámica de la Luz “DLS” (Dynamic Light Scattering) | 19 |
| 2.7.1.1.2 20 | |
| 2.7.1.1.3 Microscopía | 20 |
| 2.7.1.1.4 Microscopía de Transmisión (TEM) | 20 |
| 2.7.1.1.5 Microscopía de Barrido (“SEM” – Scan Electron Microscopy) | 21 |
| 2.7.1.2 Potencial Z..... | 21 |
| 2.8 Combinación de materiales en la elaboración de Nanopartículas (generando sistemas duales o híbridos) | 22 |
| 2.9 Uso del Recubrimiento de Superficie para crear Nanoestructuras de menor toxicidad | 23 |
| 2.10 Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas | 23 |
| 2.10.1 Terapia Génica..... | 24 |
| 2.10.2 Detección y Tratamiento de Cáncer | 24 |
| 2.10.3 Acarreadores de principio activo como Sistema de Liberación | 25 |
| 2.10.4 Nanopartículas de Polietil cianoacrilato (PECA). | 25 |
| 2.10.5 Nanopartículas de SiO ₂ | 26 |
| 2.11 Efectos biológicos asociados a la exposición in vivo de Nanopartículas | 26 |
| 2.11.1 Interacción | 26 |
| 2.11.1.1 Nanopartículas con Proteínas | 27 |
| 2.11.2 Captación de Nanopartículas | 27 |
| 2.12 Nanotoxicología | 28 |
| 2.12.1 Definición | 28 |
| 2.12.2 Estado del arte | 30 |
| 2.12.2.1 Toxicidad de las Nanopartículas de Polietil cianoacrilato (PECA) | 30 |
| 2.12.2.2 Toxicidad de Nanopartículas de Dióxido de Silicio (SiO ₂) | 31 |

| | |
|--|----|
| 2.12.3 Toxicocinética de Nanopartículas | 31 |
| 2.12.3.1 Absorción de las Nanopartículas in vivo | 32 |
| 2.12.3.2 Distribución de las Nanopartículas | 33 |
| 2.12.3.2.1 Efecto de los factores de Translocación y Distribución de Nanopartículas | 33 |
| 2.12.3.3 Excreción de las nanopartículas | 33 |
| 2.12.4 Toxicodinamia | 34 |
| 2.12.4.1 Órganos blanco para toxicidad causada por nanopartículas..... | 34 |
| 2.12.4.2 ERO y Radicales Libres | 34 |
| 2.12.4.3 Lípidos..... | 35 |
| 2.12.4.3.1 Lipoperoxidación..... | 36 |
| 2.12.5 Mecanismos Antioxidantes | 37 |
| 2.12.5.1 Glutación (GSH) | 38 |
| 2.12.5.1.1 Síntesis de Glutación..... | 38 |
| 2.12.5.1.2 Funciones..... | 38 |
| 2.12.6 Citotoxicidad | 39 |
| 2.12.6.1 Definición..... | 39 |
| 2.12.6.2 Pruebas in vivo (fundamentos y consideraciones generales)..... | 40 |
| 2.12.6.2.1 GSH..... | 40 |
| 2.12.6.2.2 TBARS | 40 |
| 3 Planteamiento del problema..... | 42 |
| 4 Objetivos..... | 43 |
| 4.1 General..... | 43 |
| 4.2 Particulares..... | 43 |
| 5 Materiales y métodos..... | 43 |
| 5.1 Aparatos y Equipos..... | 43 |
| 5.2 Reactivos y Soluciones | 43 |
| 5.2.1 Nanopartículas | 43 |
| 5.2.2 Ensayos de Citotoxicidad..... | 44 |
| 5.2.2.1 PBS, Buffer de fosfatos, pH 7.2 – 7.4 | 44 |
| 5.2.2.2 TBARS..... | 44 |
| 5.2.2.2.1 PBS con inhibidores de proteasas | 44 |
| 5.2.2.3 BRADFORD | 44 |
| 5.2.2.4 GSH..... | 44 |
| 5.3 Metodología..... | 45 |
| 5.3.1 Preparación de los sistemas nanoparticulados | 45 |
| 5.3.1.1 Control SiO ₂ | 45 |
| 5.3.1.2 Control PECA | 45 |
| 5.3.1.3 Sistema 1 SiO ₂ /PECA | 45 |
| 5.3.1.4 Sistema 2.1 PECA/SiO ₂ | 45 |
| 5.3.1.5 Sistema 2.2 PECA/SiO ₂ | 46 |
| 5.3.2 Purificación de los Sistemas | 46 |
| 5.3.3 Dilución de los sistemas para la administración de las ratas..... | 46 |
| 5.3.4 Secado de los sistemas nanoparticulados para calcular su concentración. | 46 |
| 5.3.5 Manejo de modelos animales | 46 |
| 5.3.6 Pruebas detalladas de citotoxicidad in vivo | 47 |
| 5.3.6.1 Tratamiento de las muestras (órganos)..... | 47 |
| 5.3.6.2 Tratamiento de las muestras (plasma) | 48 |
| 5.3.6.3 Determinación de TBARS (especies reactivas de oxígeno) en microplaca 96 pozos..... | 48 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.3.6.4 | Determinación de GSH (Glutación Reducido) por método fluorométrico en muestras de órganos..... | 48 |
| 5.3.6.5 | Cuantificación de GSH (Glutación Reducido) por método fluorométrico en muestras de plasma | 49 |
| 5.3.6.6 | Determinación de proteínas, método de Bradford en microplaca (96 pozos) | 49 |
| 6 | Resultados y análisis..... | 50 |
| 6.1 | Caracterización de Nanopartículas | 50 |
| 6.2 | Seguimiento del peso de las ratas..... | 56 |
| 6.3 | Evaluaciones Citotóxicas | 57 |
| 6.3.1 | Comparación de Medias entre grupos..... | 65 |
| 7 | Conclusiones..... | 71 |
| 8 | Perspectivas | 71 |
| 9 | Bibliografía..... | 72 |
| 10 | Anexos | 76 |
| 10.1 | ANEXO I: Información Teórica Complementaria..... | 76 |
| 10.1.1 | Sistema del Glutación..... | 77 |
| 10.2 | ANEXO II - Caracterización de Tamaño de Partícula y Potencial Z | 77 |
| 10.3 | ANEXO III: Curvas de Calibración para Cuantificar los índices de Citotoxicidad..... | 79 |
| 10.4 | ANEXO III - Análisis Estadístico..... | 82 |
| 10.4.1 | Gráficos de la Comparación de Medias..... | 82 |

Índice de figuras

| | | |
|---------|--|----|
| FIG. 1 | "REPRESENTACIÓN DE LOS DIFERENTES TAMAÑOS DE ORGANISMOS BIOLÓGICOS" | 10 |
| FIG. 2 | "REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE NANOESFERAS (NS), NANOCÁPSULAS QUE CONTIENEN AGUA (W-NC), NANOCÁPSULAS QUE CONTIENEN ACEITE (O-NC)" (NICOLAS & COUVREUR, 2009)..... | 15 |
| FIG. 3 | "PASOS DE INICIACIÓN A) POR UNA BASE (B-), B) NUCLEÓFILO (NÜ), C) RADICAL P [•] ; Y PROPAGACIÓN A) ANIÓNICA, B) ZWITERIÓNICA Y C) POR RADICALES LIBRES DURANTE LA POLIMERIZACIÓN DE MONÓMEROS DE ALQUILCIANOACRILATO" | 16 |
| FIG. 4 | "PLURONIC®, TENSOACTIVO NO IÓNICO EMPLEADO EN LA ELABORACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE SiO ₂ , PECA Y SU COMBINACIÓN"..... | 17 |
| FIG. 6 | "POLIMERIZACIÓN VINÍLICA ANIÓNICA (EN CADENA O ADICIÓN) DEL PACA; LA REACCIÓN TOMA LUGAR EN MICELAS DESPUÉS DE LA DIFUSIÓN DE LOS MONÓMEROS MOLECULARES EN LA FASE ACUOSA (MOLÉCULA, 2011)" | 18 |
| FIG. 5 | "REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA FORMACIÓN DE PACA POR LA VÍA DE POLIMERIZACIÓN ANIÓNICA PASO A PASO EN EMULSIÓN/DISPERSIÓN. A) INICIACIÓN, B) PROPAGACIÓN REVERSIBLE Y C) TERMINACIÓN REVERSIBLE (NICOLAS & COUVREUR, 2009)..... | 17 |
| FIG. 7 | "A) LUZ DISPERSADA POR LAS PARTÍCULAS CAYENDO EN EL DETECTOR. B) PATRÓN MOTEADO (SPECKLE PATTERN) OBTENIDO EN EL DETECTOR, CADA ZONA BLANCA ES LA LUZ DISPERSADA POR CADA PARTÍCULA EN UN INTERVALO DE TIEMPO" (ZETASIZER NANOSERIES USER MANUAL, 2004)..... | 20 |
| FIG. 8 | "DIAGRAMA DEL RAYO DE UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO: DE IZQUIERDA A DERECHA TEM, DE DERECHA A IZQUIERDA ES DE BARRIDO. AP: APERTURA, COND: CONDENSADOR, PROJ: PROYECTOR. SAED: DIFRACCIÓN ELECTRÓNICA DEL ÁREA SELECCIONADA" (P. POOLE JR. & OWENS, 2003). | 20 |
| FIG. 9 | "DETECTORES EN LA COLUMNA DE UN MICROSCOPIO DE ELECTRONES" (P. POOLE JR. & OWENS, 2003) | 21 |
| FIG. 10 | "PARTÍCULA CARGADA NEGATIVAMENTE RODEADA POR UNA DOBLE CAPA ELÉCTRICA QUE INICIA CON EL PRIMER POTENCIAL QUE DA SU SUPERFICIE Ψ HASTA LA CAPA DE CIZALLAMIENTO (SLIPPING PLANE). LA PRIMERA CAPA QUE RODEA LA PARTÍCULA Y ESTÁ UNIDA FUERTEMENTE A ÉSTA, ES LA CAPA DE STERN "Ω". EL POTENCIAL Z "Z" ES LA DIFERENCIA DE POTENCIAL ENTRE LA CAPA DE CIZALLAMIENTO Y EL SENO DE LA SOLUCIÓN. LA CAPA DIFUSA COMIENZA DONDE TERMINA LA CAPA DE STERN, Y LOS IONES ESTÁN DÉBILMENTE UNIDOS" (ZETASIZER NANOSERIES USER MANUAL, 2004). | 22 |
| FIG. 11 | "MOLÉCULA (MONÓMERO) DE ECA" | 25 |

| | |
|---|----|
| FIG. 12 "POSIBLE ARREGLO ESTRUCTURAL DE LAS MOLÉCULAS DE SiO ₂ " | 26 |
| FIG. 13 "POSIBLES VÍAS DE DEGRADACIÓN PARA LOS POLÍMEROS DE PACA: A) HIDRÓLISIS DEL GRUPO ESTER, B) REACCIÓN DE DEPOLIMERIZACIÓN "UNZIPPING", C) REACCIÓN DE CONDENSACIÓN INVERSA DE KNOEVENAGEL Y D) LIBERACIÓN DE FORMALDEHÍDO DE LA HIDROLISIS DEL GRUPO A-HIDROXIL (NICOLAS & COUVREUR, 2009) (FATTAL, PERACCHIA, & COUV, 1997)". | 30 |
| FIG. 14 "POSIBLES FACTORES QUE AFECTAN LA TRANSLOCACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS IN VIVO" | 33 |
| FIG. 15 "OXIDACIÓN DE LOS LÍPIDOS INICIADA POR LA ABSTRACCIÓN DE UN ÁTOMO DE HIDRÓGENO, LO QUE GENERA UN RADICAL LIBRE CENTRADO EN CARBONO (KONIGSBERG FAINSTEIN, 2008)" | 36 |
| FIG. 16 "DAÑO PRODUCIDO POR LOS RADICALES LIBRES A LOS FOSFOLÍPIDOS DE LAS MEMBRANAS CELULARES. LOS RADICALES LIBRES SE FIJAN EN DIVERSOS PUNTOS DE LAS CADENAS Y LAS "PUENTEAN", LAS DESORGANIZAN Y LAS ROMPEN" (CASTILLO, 2001) | 36 |
| FIG. 18 "GENERACIÓN DE ERO; MP, MIELOPEROXIDASA; SOD, SUPERÓXIDO DISMUTASA" (CASTILLO, 2001) | 37 |
| FIG. 17 "FORMACIÓN DE MDA POR LA REACCIÓN DE UN RADICAL PEROXILO CON LOS DOBLES ENLACES DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (PUFA)". | 37 |
| FIG. 19 " CICLO DEL GSH; LA ACTIVIDAD GPX ESTÁ REGULADA POR LA CONCENTRACIÓN DE SUS SUSTRATOS, MIENTRAS QUE LOS NIVELES DE GSSG POSIBLEMENTE A UNA MAYOR ACTIVIDAD DE LA GPX; REGULAN LA ACTIVIDAD DE LA GRD. EL ESTADO REDOX CELULAR Y LA RELACIÓN GSH/GSSG PARTICIPAN EN LA ACTIVACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES" (RAMÍREZ, REYES, LIBERONA, BUSTAMENTE, SÁEZ, & GISELLA, 2007) | 39 |
| FIG. 20 "REACCIÓN DEL TBA CON MDA" | 40 |
| FIG. 21 "INTERACCIÓN DEL GSH EN LA REDUCCIÓN DE H ₂ O ₂ Y FORMACIÓN DE MDA COMO PRODUCTO DE LA LIPOPEROXIDACIÓN, ÉSTE REACCIONA CON EL TBA FORMANDO EL ADUCTO 1,2 QUE ABSORBE A UNA λ DE 540 NM" (GASCA ZACARÍAS, 2011) | 41 |
| FIG. 22 "CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS A) TAMAÑO DE PARTÍCULA (NM), B) POTENCIAL Z (mV) | 50 |
| FIG. 23 "RESULTADOS DE LAS MICROGRAFÍAS DE TEM PARA LOS DIFERENTES SISTEMAS NANOPARTICULADOS SiO ₂ (A Y B), PECA (C Y D), SiO ₂ /PECA (E Y F), 2.1 PECA/SiO ₂ (G Y H) 2.2 PECA/SiO ₂ (J). | 52 |
| FIG. 24 "RESULTADOS DE LAS MICROGRAFÍAS DE SEM PARA LOS DIFERENTES SISTEMAS NANOPARTICULADOS: PECA (A), SiO ₂ (B), SiO ₂ /PECA (C) Y PECA/SiO ₂ (D) | 53 |
| FIG. 25 "SEGUIMIENTO DEL PESO DE LAS RATAS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS A) PECA B) SiO ₂ C) SiO ₂ /PECA Y D) PECA/SiO ₂ "; A PARTIR DEL DÍA 8 SE ADMINISTRARON LOS TRATAMIENTOS" | 56 |
| FIG. 26 "POSIBLE CORRELACIÓN ENTRE LOS 2 ANALITOS EVALUADOS COMO PARÁMETROS DE CITOTOXICIDAD" | 57 |
| FIG. 27 "REPRESENTACIÓN DE LA FORMACIÓN DE MDA A PARTIR DE LOS PUFA AUTO OXIDADOS Y LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FORMACIÓN DE MDA DERIVADA DE LÍPIDOS Y EL ADUCTO 1:2 MDA: TBA (NO SE REPRESENTA NI LA FORMACIÓN METABÓLICA (FIG. 28) NI EL PRODUCTO MDA/TBARS NO LIPÍDICO" (JANERO, 1990) | 58 |
| FIG. 28 "FORMACIÓN METABÓLICA DE MDA DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (AA) DURANTE LA BIOSÍNTESIS DE EICOSANOIDES. EL MDA SURGE COMO UN PRODUCTO SECUNDARIO DE LA CONVERSIÓN ENZIMÁTICA DE LA PROSTAGLANDINA H ₂ (PGH ₂) EN DOS ESPECIES LIPÍDICAS, TROMBOXANO A ₂ (TxA ₂) Y ÁCIDO 12 (L)-HIDROXI-5, 8,10-HEPTADECATRIENOICO (HHT). (JANERO, 1990). | 59 |
| FIG. 29 "CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN (GSH) OBTENIDO EN PLASMA, HÍGADO Y RIÑÓN POR CADA SISTEMA NANOPARTICULADO" | 60 |
| FIG. 30 "CONCENTRACIÓN DE TBARS EN HÍGADO Y RIÑÓN POR CADA TRATAMIENTO ADMINISTRADO EN SUS 2 DOSIS (BAJA Y ALTA)" | 60 |
| FIG. 31 "CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH) EN PLASMA POR CADA TRATAMIENTO A DOSIS BAJA (DB) Y ALTA (DA)" | 62 |
| FIG. 32 "CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH) EN HÍGADO POR CADA TRATAMIENTO A DOSIS BAJA (DB) Y ALTA (DA)". | 62 |
| FIG. 33 "CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH) EN RIÑÓN POR CADA TRATAMIENTO A DOSIS BAJA (DB) Y ALTA (DA)" | 63 |
| FIG. 34 "CONCENTRACIÓN DE TBARS EN HÍGADO POR CADA TRATAMIENTO A DOSIS BAJA (DB) Y ALTA (DA)" | 64 |
| FIG. 35 "CONCENTRACIÓN DE TBARS EN RIÑÓN POR CADA TRATAMIENTO A DOSIS BAJA (DB) Y ALTA (DA)" | 64 |
| FIG. 36 "MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DEL POLIALQUIL CIANOACRILATO: A) HIDRÓLISIS DE DEL ENLACE C – C CON LA FORMACIÓN DE FORMALDEHIDO Y CIANOACETATO. B) HIDRÓLISIS DEL GRUPO ESTER CON LA FORMACIÓN DE FRACCIONES ÁCIDAS (A. POLICIANOACRÍLICO) Y ALCOHOL. (FATTAL , PERACCHIA, & COUV, 1997) | 67 |
| FIG. 37 "DIFERENTES VÍAS DE BIOTRANSFORMACIÓN DEL FORMALDEHIDO: A. FORMALDEHIDO DESHIDROGENASA DEPENDIENTE DE GSH, B. ALDEHÍDO DESHIDROGENASA, C. LA CATALASA. D. 10-FORMILTETRAHIDROFOLATO SINTASA, E. 10-FORMILTETRAHIDROFOLATO DESHIDROGENASA. (ACHKOR, 2003) | 68 |
| FIG. 38 "REACCIONES DE DESHIDROGENACIÓN, PARA LA FORMACIÓN DE SUSTANCIAS MÁS HIDROSOLUBLES" | 68 |
| FIG. 39 "RUTAS DEL CATABOLISMO DE MDA IN VIVO. LA RUTA PREDOMINANTE INVOLUCRA AL SEMIALDEHÍDO MALÓNICO Y ACETALDEHÍDO COMO INTERMEDIARIOS Y AL CO ₂ . LAS ENZIMAS/CAMINOS METABÓLICOS EN LA TRANSFORMACIÓN DE MDA A CO ₂ O INTERMEDIARIOS DE Co-A DEL SEMIALDEHÍDO MALÓNICO SON: (A) ALDEHÍDO DESHIDROGENASA, (B) DESCARBOXILASA, (C) ACETIL-CoA SINTETASA, (D) ACETIL-CoA CARBOXILASA, (E) CICLO DEL ÁCIDO TRICARBOXÍLICO" (JANERO, 1990). | 69 |
| FIG. 40 "RESULTADOS POTENCIAL Z (A) Y TAMAÑO DE PARTÍCULA (B) DE NANOPARTÍCULAS DE SiO ₂ " | 78 |

| | |
|--|----|
| FIG. 41 "RESULTADOS POTENCIAL Z (A) Y TAMAÑO DE PARTÍCULA (B) DE NANOPARTÍCULAS DE PECA" | 78 |
| FIG. 42 "RESULTADOS POTENCIAL Z (A) Y TAMAÑO DE PARTÍCULA (B) DE NANOPARTÍCULAS DE SiO ₂ /PECA" | 78 |
| FIG. 43 "RESULTADOS POTENCIAL Z (A) Y TAMAÑO DE PARTÍCULA (B) DE NANOPARTÍCULAS DE 2.1 PECA/SiO ₂ " | 79 |
| FIG. 44 "RESULTADOS POTENCIAL Z (A) Y TAMAÑO DE PARTÍCULA (B) DE NANOPARTÍCULAS DE 2.2 PECA/SiO ₂ " | 79 |
| FIG. 45 "GRÁFICO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GSH (NMOL/ML) POR MÉTODO FLUOROMÉTRICO" | 80 |
| FIG. 47 "GRÁFICO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (MCG ASB/ML) EN LECTOR DE PLACA A 620 NM" | 81 |
| FIG. 46 "GRÁFICO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE TBARS (NMOL MDA/ML) EN LECTOR DE PLACA A 540NM" | 81 |
| FIG. 48 "RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA POR TUKEY HSD A UN 95% DE CONFIANZA DE LAS PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL TRATAMIENTO EN LAS CONCENTRACIONES DE MDA EN HÍGADO (C.) Y RIÑÓN (E.); ASÍ COMO DE GSH EN PLASMA (A.), HÍGADO (B.) Y RIÑÓN (C.)" | 82 |
| FIG. 49 "RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA POR TUKEY HSD DE LAS PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD DE GSH EN PLASMA PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE CADA SISTEMA NANOPARTICULADO A DOSIS BAJAS (A.) Y DOSIS ALTAS (B.) DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS" | 83 |
| FIG. 50 "RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA POR TUKEY HSD DE LAS PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD TBARS (A. Y B) Y GSH (C. Y D.) PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE CADA SISTEMA NANOPARTICULADO EN HÍGADO A DOSIS BAJAS (A. Y C.) Y DOSIS ALTAS (B. Y D.) PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS" | 84 |
| FIG. 51 "RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA POR TUKEY HSD DE LAS PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD TBARS (A. Y B) Y GSH (C. Y D.) PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE CADA SISTEMA NANOPARTICULADO EN RIÑÓN A DOSIS BAJAS (A. Y C.) Y DOSIS ALTAS (B. Y D.) PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS" | 85 |
| FIG. 52 "RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA POR TUKEY HSD DE LAS PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LA DOSIS POR CADA SISTEMA NANOPARTICULADO PECA (A.), SiO ₂ (B.), SiO ₂ /PECA (C.) Y PECA/SiO ₂ (D.) EN LAS CONCENTRACIONES DE GSH EN PLASMA" | 86 |
| FIG. 53 "RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA POR TUKEY HSD DE LAS PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LA DOSIS POR CADA SISTEMA NANOPARTICULADO: PECA (A. Y B.), SiO ₂ (C. Y D.), SiO ₂ /PECA (E. Y F.) Y PECA/SiO ₂ (G. Y H.) EN LAS CONCENTRACIONES DE MDA Y GSH EN HÍGADO" | 87 |
| FIG. 54 "RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA POR TUKEY HSD DE LAS PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LA DOSIS POR CADA SISTEMA NANOPARTICULADO: PECA (A. Y B.), SiO ₂ (C. Y D.), SiO ₂ /PECA (E. Y F.) Y PECA/SiO ₂ (G. Y H.) EN LAS CONCENTRACIONES DE MDA Y GSH EN RIÑÓN" | 88 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| TABLA 1 "COMPOSICIÓN DE LOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS" | 45 |
| TABLA 2 "VARIACIONES ENTRE LOS SISTEMAS HÍBRIDOS FABRICADOS" | 50 |
| TABLA 3 "RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA NANOCARACTERIZACIÓN" | 51 |
| TABLA 4 "RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS SISTEMAS" | 55 |
| TABLA 5 "CONCENTRACIÓN DE NANOPARTICULADAS ADMINISTRADA EN 0.5 ML" | 55 |
| TABLA 6 "ANOVAS RESULTANTES EN LA FIG. 48" | 65 |
| TABLA 7 "RESUMEN DE LOS TRATAMIENTOS QUE TUVIERON DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN LA FIG. 48 "RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA POR TUKEY HSD A UN 95% DE CONFIANZA DE LAS PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL TRATAMIENTO EN LAS CONCENTRACIONES DE MDA EN HÍGADO (C.) Y RIÑÓN (E.); ASÍ COMO DE GSH EN PLASMA (A.), HÍGADO (B.) Y RIÑÓN (C.)" | 65 |
| TABLA 8 "ANOVAS OBTENIDAS TRAS EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENTRE TRATAMIENTOS REFERIDOS EN LA FIG. 49 (PLASMA) FIG. 50 (HÍGADO) Y FIG. 51 (RIÑÓN)" | 65 |
| TABLA 9 "RESUMEN DE LOS RESULTADOS EN LOS QUE SE OBSERVA UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN LOS TRATAMIENTOS ADMINISTRADOS EN LA FIG. 49 (PLASMA) FIG. 50 (HÍGADO) Y FIG. 51 (RIÑÓN)" | 66 |
| TABLA 10 "ANOVAS RESULTANTES DE LAS FIG. 52(PLASMA), FIG. 53 (HÍGADO) Y FIG. 54 (RIÑÓN), QUE DETERMINAN SI LA DOSIS TIENE UN EFECTO SIGNIFICATIVO A UNA P < 0.05" | 69 |
| TABLA 11 "RESUMEN DE LOS RESULTADOS EN LOS QUE SE OBSERVA UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN LA DOSIS EN LA FIG. 52 (PLASMA), FIG. 53 (HÍGADO) Y FIG. 54 (RIÑÓN)" | 70 |
| TABLA 12 "CONCENTRACIÓN DE GSH EN DIFERENTES ÓRGANOS" | 77 |

Tabla de abreviaturas

°C: grados centígrados

BHE: barrera hemato – encefálica

EM: Microscopía Electrónica

EPR: “enhanced permeability retention” (mejora en la retención de permeabilidad)

ERN: especies reactivas del nitrógeno

ERO: especies reactivas de oxígeno

GPx: glutatión peroxidasa

GSH: Glutatión reducido

GSSG: Glutatión oxidado

HClO₄: ácido perclórico

M: molar

MDA: Malondialdehído

min.: minutos

mM: milimolar

MPS: Sistema Macro – Fagocítico (*Macrophagocytic system*)

Nanopartículas: Nanopartículas

nm: nanómetros

nM: nanomolar

PACA: polialquil cianoacrilato

PECA: polietil cianoacrilato

Poros PT Mitocondrial: Poro de transición de permeabilidad.

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

RES: sistema retículo endotelial

rpm: revoluciones por minuto

SiO₂: Dióxido de Silicio

SSF: Solución Salina Fisiológica

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico

vol/vol = volumen / volumen

Evaluación de la Citotoxicidad inducida por sistemas nanoparticulados de SiO₂/PECA en sistemas in vivo

1 INTRODUCCIÓN

Las nanociencias son un terreno nuevo, donde las leyes de la física clásica no tienen cabida. Los sistemas nanométricos tienen propiedades inherentes muy especiales debido a que las propiedades superficiales compiten con las del material en sí; es innegable el impacto que cause su estudio y el de los desarrollos nanotecnológicos en los ámbitos social, cultural y económico en la vida diaria (Chean Wong, 2005).

La aplicación médica y farmacéutica de las nanopartículas lleva 35 años; al principio, mucha gente las veía como curiosidades farmacéuticas con una aplicación limitada (Kreuter, 2007).



Fig. 1 "Representación de los diferentes tamaños de organismos biológicos"

La ocupación potencial y la revelación al público a la fabricación de nanopartículas aumentarán dramáticamente en un futuro cercano debido a la capacidad de los nanomateriales para mejorar la calidad y desempeño de muchos productos que la sociedad utiliza diariamente, así como el desarrollo de terapias y métodos de diagnóstico médicos que utilicen Nanopartículas fabricadas. Entonces, debemos estar conscientes de que el rápido desarrollo en el campo de la Nanotecnología será otra fuente de distribución de Nanopartículas al medio ambiente. De hecho, las nanopartículas han sido ampliamente aplicadas a escala industrial, como aditivos en cosméticos, tinta de impresión, cartuchos y barnices.

Actualmente se ha enfatizado en el desarrollo de formas de liberación controlada (vehículos) de fármacos para alcanzar niveles terapéuticos requeridos, mejor tolerancia (Radwan, AlQuadeib, Aloudah, & Aboul Enein, 2010), así como la vectorización de estos vehículos hasta el lugar de acción, a fin de evitar en lo posible los efectos adversos. De acuerdo con este criterio, en los últimos años se han desarrollado nuevos sistemas de administración de fármacos como los liposomas, micropartículas y nanopartículas, entre otros; los cuales son acarreadores coloidales particulares que se usan como sistemas de liberación (Ramos, Gómez, Fernández, & Nuñez, 2007).

El reto más importante en el acarreamiento de fármacos, es la síntesis de dispositivos coloidales con moléculas ligadas a la superficie para lograr una vectorización específica en la base del proceso de reconocimiento molecular (Kreuter, 2007).

En este trabajo estudiaremos los polímeros de etilcianoacrilato como material útil en la fabricación de nanopartículas. Son considerados de gran interés debido a la reactividad de sus monómeros correspondientes, que son capaces de polimerizar fácilmente en varios medios incluidos el agua. Sus propiedades adhesivas también son notables. Por eso, los cianoacrilatos empezaron a ser investigados y usados extensamente como pegamento quirúrgico. Actualmente, una aplicación importante consiste en su uso farmacéutico como acarreador de principio activo: las nanopartículas de poli (alquilcianoacrilato) PACA, son las más prometedoras entre los sistemas coloidales de acarreamiento (Fattal, Peracchia, & COUV, 1997). Desde hace más de 25 años en el campo de la Farmacología, los acarreadores de PACA han demostrado resultados significativos en numerosas patologías, tales como cáncer, infecciones (virales, bacteriológicas y parasitarias) así como en muchas enfermedades metabólicas y autoinmunes (Nicolas & Couvreur, 2009).

Otro material que estudiaremos es el dióxido de silicio (SiO₂), es un óxido no metálico con múltiples aplicaciones hoy en día; por sus propiedades eléctricas, es el mejor semiconductor y es la base en la elaboración de microchips y sensores piezoeléctricos (Arenas, Rangel, Castaño, Loa, & Vega, 2010); en el recubrimiento de polvos, mejoran su flujo (Flores Vivían, 2009); por sus propiedades ópticas en optoelectrónica y en dispositivos médicos (Chean Wong, 2005) (López, 2012) son ampliamente usados. A nivel nanométrico, presentan fotoluminiscencia, monodispersidad, gran área superficial, alta eficiencia en carga de principio activo y su potencial de hibridación con materiales orgánicos/inorgánicos (Xie, Sun, Zhong, Shi, & Zhang, 2010).

A pesar del gran interés que ha despertado la introducción de la nanotecnología en numerosos campos de aplicación, una vista en general del conocimiento actual que se tiene sobre su potencial toxicológico revela que la investigación científica está en sus inicios (Zhao & Nalwa, 2007).

De acuerdo con la Teoría de las Colisiones, una alta probabilidad de colisión entre las partículas, lleva a una ultra reactividad (Labhasetwar & Leslie-Pelecky, 2007); cuando un material es nanoestructurado adquiere nuevas propiedades, la base de esta consideración es que cada propiedad de un material dado tiene una longitud característica o crítica asociada a ella; los fundamentos de la Física y la Química cambian cuando las dimensiones de un sólido se pueden comparar con una o más de esas longitudes características, muchas son de orden nanométrico (P. Poole Jr. & Owens, 2003).

Debido a esta consideración, se asume que la toxicidad aumenta conforme el tamaño disminuye (Sohaebuddin, Thevenot, David, Eaton, & Tang, 2010) (Chean Wong, 2005); el gran área superficial que es significativa en las reacciones catalíticas, así como la interacción de partículas sólidas con células, resulta en respuestas biológicas y/o toxicológicas muy significativas (Zhao & Nalwa, 2007).

Para las nanoestructuras creadas recientemente, hay estudios limitados; ya que la estandarización de métodos de preparación con intervalos de tamaño de partícula definidos, no se ha logrado del todo hasta el momento. Sin embargo, dentro de los estudios ya realizados se ha demostrado que las nanoestructuras presentan propiedades electrónicas, ópticas y magnéticas que van de la mano con sus dimensiones físicas, estos aspectos podrían traer un efecto tóxico único que es difícil de predecir (Born, Klaessing, Landry, Moundgil, Pauluhn, & Thomas, 2006).

Así mismo, las superficies de las nanoestructuras están involucradas en muchas reacciones oxidativas y catalíticas (Nel, Xia, Mädler, & Li, 2006). Siendo este parámetro uno de los determinantes en el potencial citotóxico de las nanopartículas, se deben establecer tanto metodologías tecnológicas, como caracterizaciones citotóxicas, que determinen la seguridad de cada sistema; así mismo, correlacionar los resultados *in vitro/in vivo*; puesto que también se ha observado en numerosos estudios que la citotoxicidad va a depender del tipo de célula expuesta; los experimentos *in vitro* deben ser validados con experimentos *in vivo* para poder ser útiles (Sayes, Reed, & Warheit, 2007), teniendo en cuenta que los tipos celulares van a ser proporcionales a la gran variedad de rutas de exposición de las Nanopartículas.

Primero es importante caracterizar y distinguir, fisicoquímicamente cada partícula de diferente naturaleza química, así como los nanomateriales derivados de los diferentes procesos de síntesis, para posteriormente establecer estrategias experimentales, enfocados específicamente en el estudio de sus propiedades toxicológicas (Zhao & Nalwa, 2007).

Las Nanopartículas de diferente composición y tamaño pueden generar diferentes efectos celulares, los cuales pueden no correlacionarse directamente con otras respuestas intracelulares y los mecanismos asociados con su citotoxicidad pueden ser muy diversos.

Es por esto que se necesitan estudios que permitan la extrapolación a modelos experimentales animales con el conocimiento de las células susceptibles y las rutas potenciales de toxicidad. Las estrategias de diseño tecnológico y de ingeniería útiles en el desarrollo de sistemas nanoparticulados, se deben enfocar en los tipos celulares potencialmente expuestos. La habilidad de fabricar Nanopartículas que minimicen la citotoxicidad en un rango en que las células puedan ser potencialmente expuestas, ayudará al desarrollo de Nanopartículas e irá de la mano su seguridad (Sohaebuddin, Thevenot, David, Eaton, & Tang, 2010).

2 MARCO TEÓRICO

2.1 NANOTECNOLOGÍA

Es la capacidad técnica que involucra el diseño, manipulación, modificación, caracterización y producción de materiales para poder desarrollar estructuras o dispositivos funcionales con dimensiones inferiores a los 100 nm, controlando su forma y tamaño, con potenciales aplicaciones tecnológicas, para mejorar la calidad y características de procesos y productos ya existentes. Es una ciencia multidisciplinaria que involucra la Biología, Química, Ciencia de Materiales, Ingeniería y Física (Chean Wong, 2005).

La Nanotecnología tiene un gran potencial para dejar beneficios en el ambiente, tales como elaboración de materiales biocompatibles, producción de energía más limpia, eficiente y sustentable, tratamiento de aguas, remedios ambientales, materiales más ligeros, un mejor entendimiento y tratamiento de los sistemas vivos, procesos biotecnológicos revolucionarios, síntesis de nuevos medicamentos y formas de acarreamiento, medicina regenerativa, ingeniería neuromórfica, etc. (Zhao & Nalwa, 2007) (Malsh, 2005).

Actualmente se han elaborado transistores para circuitos integrados de los 10 a los 20 nm. Se está estudiando la síntesis de Nanopartículas metálicas y/o semiconductoras, ya que las primeras presentan propiedades ópticas no lineales, y las segundas de fotoluminiscencia. Estas propiedades dependen del tamaño, forma y distribución espacial en la muestra.

Como cualquier mejora en innovación, la nanotecnología presenta numerosas preguntas acerca de los riesgos que pueden causar al ambiente, a la salud de los trabajadores, consumidores y público. Mientras que los beneficios son ampliamente difundidos, las controversias sobre sus efectos potenciales empiezan a emerger. El desarrollo de la Nanotecnología puede implicar riesgos a la salud asociados a la exposición de los materiales en tamaños nanométricos durante su fabricación, uso y eliminación ya que la actividad biológica de las partículas que son introducidas en organismos vivos tiende a incrementarse conforme su tamaño decrece.

Se deben identificar los riesgos de los nanomateriales antes de que sean incorporados en los productos comerciales. Definitivamente debe aclararse la biocompatibilidad de las Nanopartículas así como la investigación activa para garantizar una industria nanotecnológica sustentable (Zhao & Nalwa, 2007).

“La nanotecnología será la ciencia del siglo XXI, está abriendo el camino a la próxima revolución industrial; el impacto social, cultural y económico que tendrá en nuestra vida diaria es apenas imaginable, la nanotecnología bien puede cambiar el mundo” (Chean Wong, 2005).

2.2 HISTORIA DE LAS NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas han sido utilizadas desde hace varios años... los alquimistas usaban el *aurum potabile* (oro coloidal) y *luna potabile* (plata coloidal) como elixires en la Edad Media. En 1857, Faraday describió el primer método de preparación de nanopartículas de oro (Zhao & Nalwa, 2007).

Los primeros nanotecnólogos fueron artesanos que trabajaban el vidrio y decorado en cerámica. Las nanopartículas metálicas les confieren sus intensas tonalidades; las nanopartículas de oro están en los vidrios rojos, y las de plata en los amarillos (Chean Wong, 2005).

Viéndolo desde el lado farmacéutico...

Paul Erlich pensó que la liberación controlada podría mejorar la terapia farmacológica, llamó a este sistema “balas mágicas” aunque por sus intereses personales en bacteriología e inmunología, tenía en mente el uso de anticuerpos; de aquí surgió el concepto de nanopartículas y de “drug targeting” (Kreuter, 2007).

El Profesor Speiser’ desarrolló un sistema de liberación miniaturizado como sistema de liberación controlada: primeras nanopartículas poliméricas. Su grupo investigó primero las perlas de poliacrílico para administración oral, después microcápsulas y a finales de los 60’s desarrolló las primeras nanopartículas como sistemas de liberación y vacunas. En 1969, su estudiante Gerd Birrenbach trabajó en este concepto, usando un proceso llamado “polimerización micelar”. Los resultados fueron prometedores, pero no se desarrollaron, debido a las grandes cantidades de fase orgánica, tensoactivos requeridos y por la alta toxicidad del monómero de acrilamida. Sin embargo, con este proceso se obtenían nanopartículas monolíticas con una fase continua.

La tarea de su segundo alumno Helmunt Kopf fue obtener nanopartículas para liberación sostenida intravenosa.

Kreuter (3er alumno) tenía que encapsular o ligar virus inactivados o subunidades de antígenos de influenza a Nanopartículas; utilizó la “emulsión polimerización”: polimerización heterogénea en un medio acuoso circundante. Este término es engañoso, ya que este proceso también se puede llevar a cabo sin los emulsionantes adicionales, dependiendo de la solubilidad del monómero en agua. La presencia de emulsificantes y por lo tanto, del número de micelas, no afecta el número de partículas formadas. Utilizó metil – metacrilato; la polimerización y formación de Nanopartículas puede llevarse a cabo con rayos gamma, agua o buffer salino de fosfatos, sin agregar ningún otro material.

Richard Oppenheim con su alumno Jennifer Marty, desarrolló Nanopartículas de albúmina y gelatina por *desolvatación* que ocurre con la adición de un agente *desolvante* (desolvating) como un alcohol o sal en grandes concentraciones; esto lleva a la coacervación y formación de microcápsulas. Adaptaron este proceso, y añadieron el agente desolvante lentamente antes de que la fase de separación ocurriera; así las moléculas se compactan, enrollan y se entrecruzan con aldehídos, esta estructura se puede mantener y formar las Nanopartículas. 20 años después este proceso se utilizó para el transporte de oligonucleótidos a través de la membrana, ácidos nucleicos y péptidos. Esto se mejoró con el anclaje de anticuerpos y el transporte a través de la barrera hemato encefálica (BHE), por la unión covalente de apolipoproteína E.

Patrick Couvreur encontró los efectos lisosómicos de las Nanopartículas, después produjo las primeras Nanopartículas rápidamente biodegradables hechas de *poli metil cianoacrilato* y *poli etil cianoacrilato (PECA)*.

El primer artículo sobre Nanopartículas apareció en 1978. Se desarrolló la primera definición de Nanopartículas para propósitos farmacéuticos y médicos.

Maineet (1984, 1986) fue el primero en demostrar que las nanopartículas también pueden mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos. También se desarrollaron Nanopartículas para liberación ocular.

El primer producto comercial nanoparticulado conteniendo un fármaco (Abraxane, nanopartículas de albúmina sérica humana conteniendo paclitaxel), apareció en el mercado a principios del 2005. Las Nanopartículas para diagnóstico se han vendido por más de 10 años. El segundo producto basado en Nanopartículas de poli (isohexil cianoacrilato) (Doxorubicin – Transdrug^R) está siendo desarrollada por la compañía BioAlliance^R en Paris para el tratamiento de los carcinomas hepatocelulares resistentes y la fase clínica

I/II/III se ha llevado a cabo (Kreuter, 2007). Su complejidad se alcanzó al cambiar de forma adecuada sus propiedades en la superficie para controlar su destino *in vivo* (Nicolas & Couvreur, 2009).

2.3 DEFINICIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Según la Enciclopedia de Tecnología Farmacéutica, que a su vez se basó en la definición establecida por Kreuter y colab. 2007, son partículas coloidales que se encuentran en un rango de tamaño de 1 hasta 1000nm (1µm), las cuales consisten de materiales macromoleculares y pueden ser usadas terapéuticamente como acarreadores de fármacos, en las cuales el activo (fármaco o material biológicamente activo) está disuelto, entrampado, encapsulado, adsorbido o enlazado en la matriz de la nanopartícula (Kreuter, 2007).

Son sistemas coloidales submicrónicos (<1 µm) sintetizadas generalmente de polímeros naturales. De acuerdo con la estructura morfológica, se pueden obtener *nanoesferas* o *nanocápsulas*.

Las **nanoesferas** son sistemas matriciales donde el fármaco es dispersado en toda la partícula o adsorbida en su superficie (Fig. 2, NS)

Las **nanocápsulas** (Fig. 2, NC) son sistemas vesiculares en donde el fármaco es encapsulado dentro de una cavidad rodeada por una cubierta polimérica única (Fattal, Peracchia, & COUV, 1997).

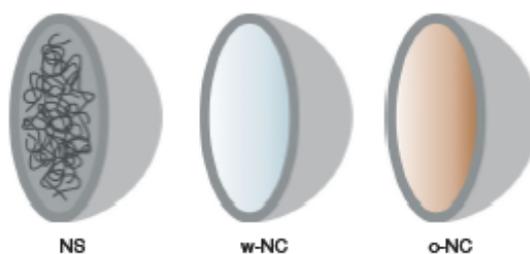


Fig. 2 "Representación esquemática de nanoesferas (NS), nanocápsulas que contienen agua (w-NC), nanocápsulas que contienen aceite (o-NC)" (Nicolas & Couvreur, 2009).

2.4 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

La elección de la técnica de preparación depende de las características del material formador del sistema y de la solubilidad del principio activo que se desea incorporar.

Las nanopartículas se han preparado con mayor frecuencia por tres métodos:

- Dispersión de polímeros preformados: Nanopartículas biodegradables.
 - Método de evaporación del disolvente
 - Difusión de disolvente o emulsificación espontánea.
 - Método de doble o múltiple emulsión, para encapsular compuestos hidrófilos.
- Polimerización: Nanopartículas en solución acuosa
 - Polimerización – Emulsificación
 - Fase continua acuosa
 - > Polimerización de radical libre
 - > Polimerización aniónica/anfótera: PECA (

> Fig. 3)

- Fase continua orgánica

- Salting-out
- Gelificación iónica o coacervación de polímeros hidrofílicos.
- Nanoprecipitación

Sin embargo, otros métodos tales como la tecnología de fluidos supercríticos también se han descrito en la literatura para la producción de nanopartículas (Díaz Padilla, 2013).

2.5 NANOPARTÍCULAS DE POLIALQUIL CIANOACRILATO

Una ventaja de las Nanopartículas poliméricas es su fácil preparación en tamaños deseados, lo cual es benéfico en la regulación de la biodistribución.

Las Nanopartículas de PACA pueden sintetizarse por 3 vías de polimerización predominando las dos primeras, aniónica (a) y zwitteriónica (b) de la

Fig. 3.

En 1979, Couvreur desarrolló un proceso sencillo para obtener Nanopartículas de PECA estables, agregando gota a gota el monómero en una solución de HCl en agitación ($2 < \text{pH} < 3$) conteniendo un tensoactivo no iónico (Fig. 4) o macromolecular.

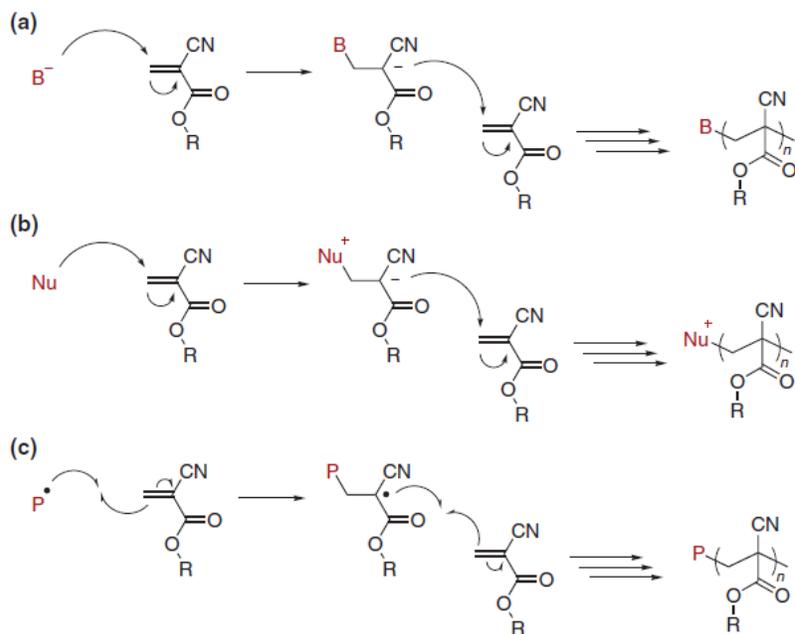
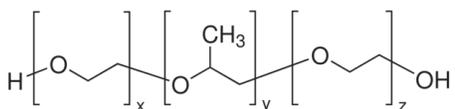


Fig. 3 "Pasos de iniciación a) por una base (B⁻), b) nucleófilo (Nu⁺), c) Radical P[·]; y propagación a) aniónica, b) zwitteriónica y c) por radicales libres durante la polimerización de monómeros de alquilcianoacrilato"

Se ha demostrado que la naturaleza y concentración del tensoactivo, juega un papel significativo en el tamaño de partícula. Cuando se forman micelas esféricas, dependiendo del Pluronic® (Fig. 4), se obtiene un diámetro hidrodinámico de 20 a 80 nm (Kabanov, Batrakova, & Alakhov, 2002).



El tamaño de los objetos coloidales obtenidos está entre 50 y 300 nm, lo cual es ideal para dispositivos acarreadores que se administren por vía intravenosa.

Fig. 4 "PLURONIC®, tensoactivo no iónico empleado en la elaboración de las Nanopartículas de SiO₂, PECA y su

Se ha reportado que la **polimerización emulsión/dispersión** en medio ácido procede paso a paso: un mecanismo aniónico que comprende una *propagación reversible* (b, Fig. 5) y una *terminación reversible*, (c, Fig. 5) básicamente; los oligómeros de PACA se forman en las gotas de monómero y terminan de forma reversible por la inhibición ácida.

Este paso es seguido por una reacción de *re-iniciación* de las especies terminadas por las cadenas activas, llevando a una polimerización adicional hasta que se alcance un equilibrio en el peso molecular, esto es similar a un evento de *depolymerización/repolimerización*. Se debe tener en cuenta que en estos mecanismos se propone que la polimerización inicia por los iones hidroxilos de la fase acuosa, independientemente de otros reactivos en el medio.

Hasta el momento, la mini emulsión/polimerización es la técnica más común y sencilla para la síntesis de nanoesferas de PACA (Nicolas & Couvreur, 2009).

El pH del medio determina tanto el grado de polimerización como la absorción del principio activo cuando éste es ionizable. El principio activo puede combinarse con las nanopartículas después de la disolución en el medio de polimerización, antes de la introducción del monómero o después de su polimerización. El tamaño obtenido de las nanoesferas es de aproximadamente 200 nm, pero puede reducirse a 30 – 40 nm usando un

tensoactivo no iónico en el medio de polimerización, o añadiendo SO₂ al monómero. (Fattal, Peracchia, & COUV, 1997)

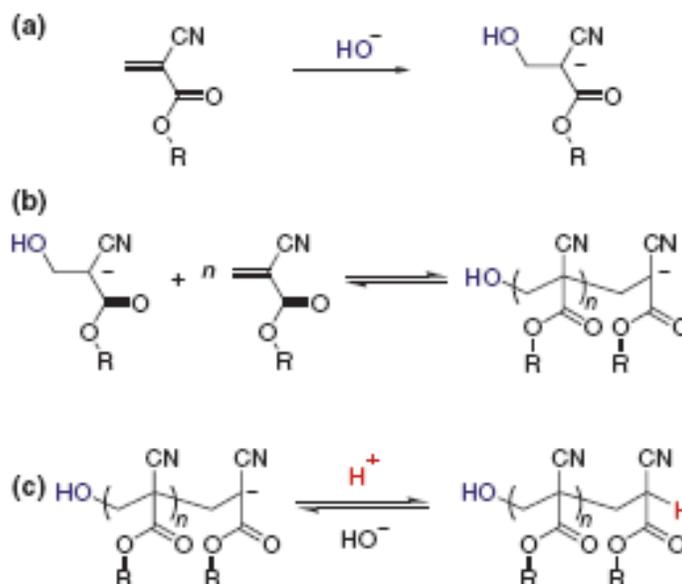


Fig. 5 "Representación esquemática de la formación de PACA por la vía de polimerización aniónica paso a paso en emulsión/dispersión. a) Iniciación, b) Propagación reversible y c) Terminación reversible (Nicolas & Couvreur, 2009)

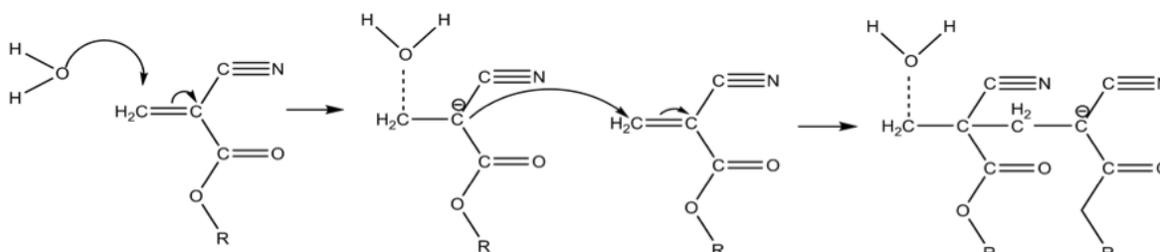


Fig. 6 "Polimerización vinílica aniónica (en cadena o adición) del PACA; la reacción toma lugar en micelas después de la difusión de los monómeros moleculares en la fase acuosa (Molécula, 2011)"

La existencia del Pluronic F-68 (Fig. 4) en el medio de polimerización de las Nanopartículas de PECA mejora la absorción del principio activo (Radwan, AlQuadeib, Aloudah, & Aboul Enein, 2010).

2.6 PURIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Dependiendo del objetivo que se plantee para los sistemas nanoparticulados, será el método de purificación que se aplique. La idea principal, es la remoción de los restos de reactivos y sustancias que no reaccionaron, excesos de solvente, tensoactivos, iones, etc., que pueden resultar indeseables en la presentación final del sistema.

Los métodos más usados son la filtración en gel, la ultracentrifugación y la diálisis. El problema en la mayoría de los casos es la repetibilidad en el escalamiento, pero este en general, es un punto a tratar en la cuestión de validez en la nanotecnología.

Otro punto a considerar es la vía de administración a la cual se someterá el sistema, ya que si éste se pretende para administraciones intraperitoneales o intravenosas, deberá cumplir con parámetros de esterilidad.

Como ya se sabe, el tamaño de las nanopartículas es menor a 1 µm, por lo que el método físico a través de mallas de 0.22 µm puede no ser suficiente, también considerando que muchos microorganismos logran pasar los poros de la membrana. Por esto se puede recurrir al trabajo en condiciones asépticas desde un principio. Otra alternativa es someter los sistemas a radiación, o incluso por calor (autoclave). El método va a depender 100% de las propiedades de estabilidad de las nanopartículas, así como del principio activo que contengan en el caso de que estén como acarreadores. Considerando que en primera instancia el método puede cambiar las propiedades físicas de la Nanopartícula. Hace algún tiempo, las modificaciones ocurrían como consecuencia de rompimiento del entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, pero pueden ser resultado de la alteración de otros componentes como los agentes de superficie o los mismos fármacos (Díaz Padilla, 2013).

2.7 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Los parámetros a considerar para la caracterización (determinación de propiedades fisicoquímicas) de las nanopartículas son:

- *Tamaño de partícula:*
- *Estado de aglomeración*
- *Forma*
- *Dureza*
- *Densidad*
- *Peso molecular*
- *Aspecto (aspect ratio)*
- *Estructura cristalina*
- *Solubilidad: Deformabilidad*
- *Composición y reactividad química*
- *Área superficial*
- *Carga superficial y química*
- *Modificaciones en el tipo de recubrimiento*
- *Estabilidad*
- *Configuración geométrica.*

Hay distintos métodos para determinar estos parámetros los cuales son representados en (De la Cruz Medina, 2010). El tamaño y la composición química de las nanopartículas les dan propiedades funcionales particulares; la relación de área superficial por unidad de masa es muy grande y, como consecuencia muestran una reactividad química más alta que permite el anclaje, adsorción y acarreamiento de diferentes compuestos tales como fármacos, sondas y proteínas (Zhao & Nalwa, 2007).

La dispersión / aglomeración de las partículas también juegan roles importantes; al ser tan grande el área superficial. Se ha demostrado que la presencia de cationes monovalentes y divalentes causa que éstas se aglomeren; también se ha encontrado que los nanomateriales de óxidos metálicos adsorben componentes del medio, tales como Ca²⁺ y proteínas séricas, las cuales afectan su aglomeración y la distribución del tamaño (Sohaebuddin, Thevenot, David, Eaton, & Tang, 2010).

Al parecer, las propiedades de los materiales y la geometría de los nanomateriales pueden tener un efecto más prominente en las respuestas celulares, que el tamaño por sí solo (Sohaebuddin, Thevenot, David, Eaton, & Tang, 2010).

En el diseño de un sistema de acarreamiento nanoparticulado, todas las nanocaracterísticas le van a conferir propiedades en distribución, translocación, acumulamiento, liberación, degradación y eliminación en los modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* según sea el caso.

2.7.1 Técnicas empleadas para la caracterización de sistemas nanoparticulados

2.7.1.1 Tamaño de partícula

El *tamaño de partícula* es el diámetro de la esfera que difunde a la misma velocidad que la partícula que está siendo medida. Las partículas en líquidos se mueven aleatoriamente y su velocidad de movimiento se usa para determinar su tamaño.

Para esto el equipo mide el movimiento Browniano de las partículas en una muestra utilizando la Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) y después interpreta el tamaño utilizando teorías establecidas.

2.7.1.1.1 Espectroscopía de correlación de fotones "PCS" (Photon Correlation Spectroscopy) o Dispersión Dinámica de la Luz "DLS" (Dynamic Light Scattering)

Se basa en la interacción de las partículas con un haz de luz incidente. El equipo hace incidir el haz de luz sobre la muestra, las partículas la difractan y se obtiene un *patrón moteado* (ej. Fig. 7.b), se obtienen varios en intervalos de tiempo muy cortos (de nano a microsegundos), y mide la fluctuación que tiene la intensidad de la luz dispersa entre cada uno de ellos causada por el movimiento Browniano (velocidad), y la relaciona con el tamaño; esta relación se define como la *ecuación de Stokes-Einstein* (Zetasizer Nanoseries User Manual, 2004).

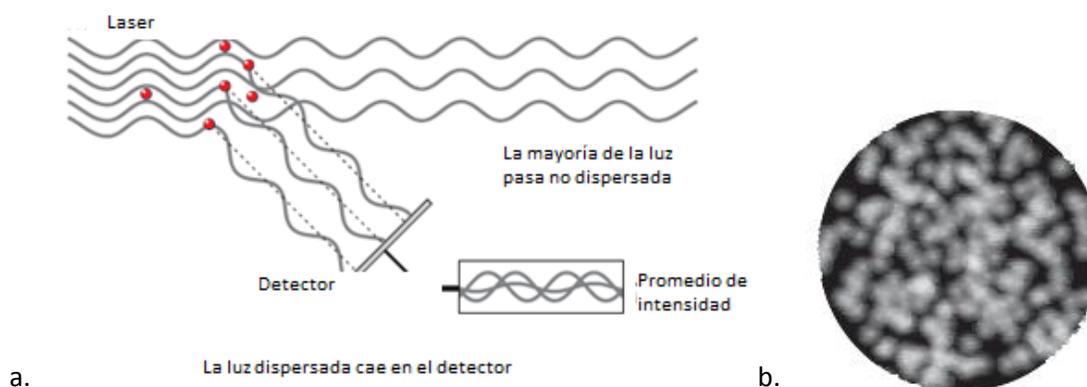


Fig. 7 "a) Luz dispersada por las partículas cayendo en el detector. b) Patrón moteado (speckle pattern) obtenido en el detector, cada zona blanca es la luz dispersada por cada partícula en un intervalo de tiempo" (Zetasizer Nanoseries User Manual, 2004)

Sin la Microscopía la Nanotecnología no habría tenido tantos avances, ya que es una herramienta muy útil para caracterizar los sistemas preparados. La difracción de rayos X puede estimar los tamaños promedio, pero la Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM) es necesaria para determinar la distribución real de los tamaños. El Microscopio electrónico utiliza un haz electrónico para proporcionar información sobre la superficie (P. Poole Jr. & Owens, 2003).

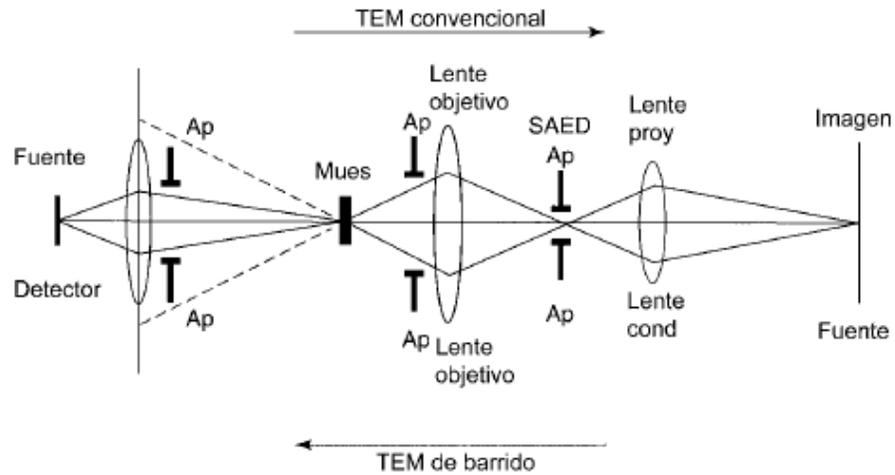


Fig. 8 "Diagrama del rayo de un Microscopio Electrónico: de izquierda a derecha TEM, de derecha a izquierda es de BARRIDO. Ap: apertura, Cond: condensador, Proy: proyector. SAED: Difracción electrónica del área seleccionada" (P. Poole Jr. & Owens, 2003).

2.7.1.1.3 Microscopía de Transmisión (TEM)

Los electrones entran en la muestra, se dispersan y se enfocan con un objetivo, se amplifican con un lente y la imagen es proyectada. En este microscopio, la imagen es generada mediante el uso de la difracción electrónica del área seleccionada (SAED: *Diffracted Electron of the Selected Area*), abertura localizada entre las lentes del objetivo y el proyector (Fig. 8). La parte principal del haz electrónico transmitido por la muestra consiste en electrones que no han sufrido dispersión alguna. El haz también contiene electrones que han perdido energía mediante dispersión inelástica, sin desviación de su paso, así como electrones que han sido reflejados por varios planos cristalográficos *hkl*. Para poder producir lo que se llama una *imagen de campo brillante*, la abertura se inserta de tal forma que sólo permita que pase el haz de electrones transmitidos sin desviación (Fig. 9).

2.7.1.1.4 Microscopía de Barrido ("SEM" – Scan Electron Microscopy)

Forma un patrón de rastreo en la superficie, con un haz de electrones. En un microscopio electrónico de barrido los electrones viajan de derecha a izquierda (Fig. 8), y son deflectados. La fuerza generada por el campo magnético de las bobinas deflecta a los electrones de izquierda a derecha sobre la dirección de la línea dibujada al fondo sobre la muestra.

Nanotoxicología

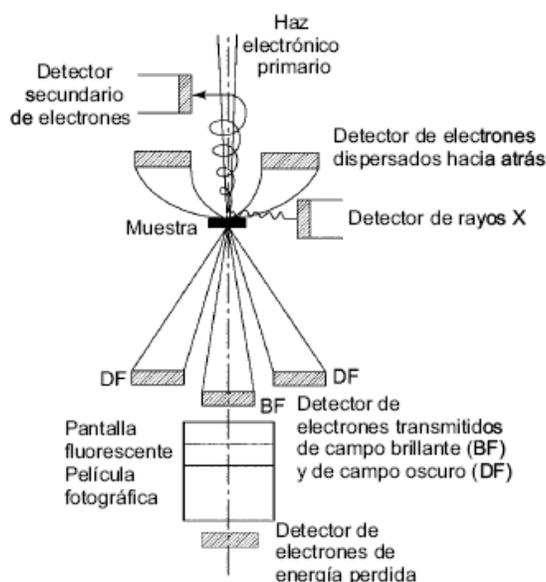


Fig. 9 "Detectores en la columna de un Microscopio de Electrones" (P. Poole Jr. & Owens, 2003)

2.7.1.2 Potencial Z

Se considera a los sistemas nanoparticulados como sistemas coloidales; se sabe que en estos sistemas sus propiedades de estabilidad van a estar dadas por distintos parámetros fisicoquímicos.

El *potencial Z* es la diferencia de potencial entre la superficie de la partícula y la capa de cizallamiento (*slipping plane*) que es el límite entre los iones del medio que se mueven con la partícula y los que no.

El equipo mide el potencial Z usando una combinación de 2 técnicas de medición: la electroforesis y el *Laser Doppler Velocimetry*, este método mide que tan rápido se mueve una partícula en un líquido cuando se le suministra un campo eléctrico, después aplica la *ley de Henry*. Conociendo esto, y usando la constante dieléctrica y de viscosidad, se puede calcular el potencial Z.

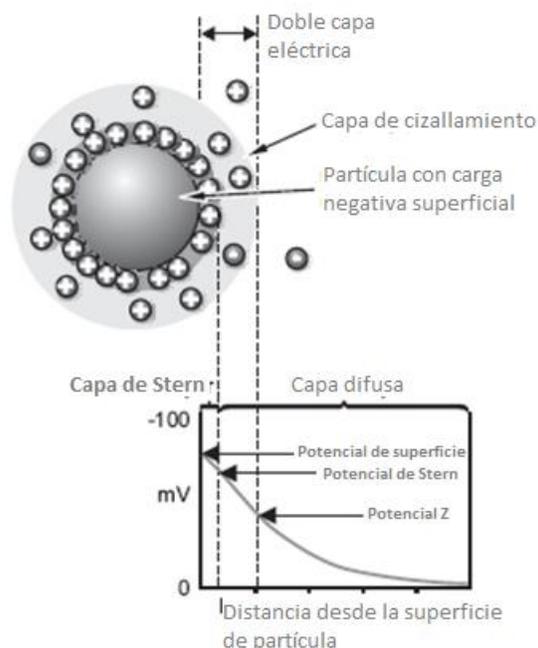


Fig. 10 "Partícula cargada negativamente rodeada por una doble capa eléctrica que inicia con el primer potencial que da su superficie Ψ hasta la capa de cizallamiento (Slipping plane). La primera capa que rodea la partícula y está unida fuertemente a ésta, es la capa de Stern " ω ". El potencial Z " ζ " es la diferencia de potencial entre la capa de cizallamiento y el seno de la solución. La capa difusa comienza donde termina la capa de Stern, y los iones están débilmente unidos" (Zetasizer Nanoseries User Manual, 2004).

La magnitud del potencial Z da indicio de la estabilidad potencial del sistema coloidal. Se consideran *estables* a los sistemas que tienen un potencial Z mayor de 30 mV y menores a -30 mV; pues en estos rangos las partículas se repelen entre sí, lo que evita su aglomeración (Gasca Zacarías, 2011).

En conjunto, las propiedades fisicoquímicas de cada sistema nanoparticulado como superficie, tamaño, forma, etc. van a conferirles *nanocaracterísticas únicas* que les permitirán el paso a través de membranas, afinidad por células y órganos blanco específicos, capacidad de adsorción de moléculas, tiempos de vida prolongados en el organismo, efectos tóxicos, etc.

2.8 COMBINACIÓN DE MATERIALES EN LA ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS (GENERANDO SISTEMAS DUALES O HÍBRIDOS)

Como ya se describió anteriormente, son muchos los factores que van a determinar el comportamiento de una Nanopartícula; las nanocaracterísticas que adquieren por los materiales, condiciones y métodos de preparación pueden manipularse variando los factores antes mencionados. Una forma de modificar las propiedades fisicoquímicas de las Nanopartículas es el recubrimiento o la combinación de materiales, para generar sistemas *híbridos*. Cuando los nanomateriales son combinados, se altera significativamente su superficie por los grupos reactivos, lo cual modifica los efectos biológicos, como la distribución en el cuerpo (Zhao & Nalwa, 2007), su acumulación y potencial toxicológico. Eventualmente, estos cambios permiten optimizar la obtención de los sistemas nanoparticulados.

2.9 USO DEL RECUBRIMIENTO DE SUPERFICIE PARA CREAR NANOESTRUCTURAS DE MENOR TOXICIDAD

Con la disminución del diámetro de la partícula, la enorme área superficial deja un espacio muy grande para permitir el cambio en las estructuras de superficie (Zhao & Nalwa, 2007).

El anclaje de pequeñas fracciones covalentes estabilizadoras en su superficie puede provocar un comportamiento diferente en un medio biológico, que aquellas con tensoactivos adsorbidos (Nicolas & Couvreur, 2009).

Una apropiada estructura puede reducir la Nanotoxicidad de forma eficiente por la optimización simultánea de la biodisponibilidad y farmacocinética (Zhao & Nalwa, 2007).

2.10 APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS

La fabricación de Nanopartículas se está llevando a cabo en gran escala. En las últimas 2 décadas, la nanotecnología ha sido extremadamente popularizada desde que Drexler en 1986 argumentó las amplias posibilidades de nanotecnología en la fabricación molecular.

Así como la nanotecnología se espera que represente una de las tecnologías más importantes del siglo XXI, los nanomateriales están recibiendo más atención por sus prometedoras aplicaciones en ingeniería y biomedicina.

El desarrollo de sistemas coloidales en nanoescala para su uso como sistemas de acarreamiento, presentan prometedoras ventajas sobre los sistemas de liberación controlada que actualmente se encuentran en el mercado, algunas de ellas son:

- El tamaño de partícula y las características de la superficie son fácilmente manipulables.
- El control sobre la liberación del fármaco durante la transportación hasta llegar al sitio específico de acción, logrando una mayor eficacia del fármaco y reducción de los efectos adversos.
- La liberación controlada y las características de degradación de las partículas pueden ser modificadas por cambios en los constituyentes de la matriz.
- La localización en un sitio específico puede ser alterada mediante la unión de ligandos en la superficie de las partículas o usando guías magnéticas. Al *vectorizar* los sistemas de acarreamiento (Nanopartículas), las dosis administradas son menores, con lo que se reducen los efectos adversos y se incrementa el efecto del principio activo.
- La vectorización se puede lograr por:
 - **Orientación Activa:** es una biodistribución preferente hacia una *diana* basándose en procesos de reconocimiento celular (Vila Jato & Calvo) modificándose la distribución normal del mismo organismo (AL-QADI & Remuñán-López). Cuando las Nanopartículas de largo tiempo en circulación pueden alcanzar el sitio de acción aprovechando la hiperpermeabilidad de la vasculatura del tumor así como de un efecto conocido como Mayor Permeabilidad y Retención (MPR). (Kreuter, 2007) También se logra al incorporar el agente terapéutico o el sistema acarreador con un ligando específico que es reconocido por receptores de la superficie de la célula o tejido patogénico.

- **Orientación Pasiva:** se acopla el agente terapéutico a una macromolécula que alcanza el órgano blanco de forma pasiva.
- Posibilidad de solubilizar activos hidrofóbicos.
- El sistema puede ser usado para varias rutas de administración incluyendo oral, nasal, parenteral, intraocular, etc.

El comportamiento biocinético característico de las Nanopartículas provee características atractivas muy prometedoras en la aplicación médica como dispositivos y herramientas terapéuticas para investigar y entender los procesos moleculares y estructuras en células vivas.

Los nanomateriales destinados a aplicaciones biomédicas deben ser idealmente biocompatibles y biorreabsorbibles (Pastor, 2008).

2.10.1 Terapia Génica

Se han diseñado nanopartículas que puedan llevar plásmidos de ADN, oligonucleótidos, péptidos sintetizados y proteínas a órganos blanco, incluso dentro del núcleo celular, protegiendo las macromoléculas de la degradación enzimática. Hasta ahora, hay varios tipos de nanopartículas que sirven como transporte acarreador transmembranal (Zhao & Nalwa, 2007), sin embargo la disposición de los materiales incluidos y sus efectos están aún en estudio.

2.10.2 Detección y Tratamiento de Cáncer

En esta área, cuando se pretende utilizar Nanopartículas cargadas con fármacos que modifican el estado de proliferación celular en enfermedades como el cáncer, el desafío es amplio si consideramos que la terapia convencional es poco específica lo que compromete en general la viabilidad celular en los organismos. En este sentido el uso de Nanopartículas presentaría varias ventajas y metas que alcanzar. En general las Nanopartículas pueden ofrecer:

- Mejora en la eficacia terapéutica y en muchos casos la reducción de los efectos tóxicos.
- Mejor efecto por la mayor permeabilidad y retención (EPR).
- Pueden estimular potencialmente la protección del fármaco anticancerígeno de la biotransformación y eliminación.
- Mejora en la liberación de principio activo.
- Transporte de principio activo a través de la BHE.
- Con dispositivos metálicos fungen como agentes de contraste, detectan el tejido canceroso y se unen a él haciéndolo visible mediante el uso de equipo especializado (Mozafari, 2007).

La aplicación más importante de las nanopartículas se ha enfocado en la terapia contra el cáncer, ya que se aprecia una mejora en la eficacia y especificidad, en muchos casos la reducción de los efectos tóxicos como se mencionó anteriormente. Para esto las nanopartículas deben tener una biodistribución apropiada para llegar al tejido y células tumorales. En el caso de las nanopartículas de PACA, esto se puede lograr modificando la superficie (Vinod & Diandra L. , 2007).

2.10.3 Acarreadores de principio activo como Sistema de Liberación

Actualmente, las Nanopartículas han sido aplicadas en el transporte de principio activo para administraciones parenterales que promueven una liberación sostenida y/o incrementan la estabilidad de los principios activos metabolizados. Para muchos principios activos, es necesario que el sistema de transporte se libere del compartimento endosomal/ lisosomal y entre en el citoplasma para la siguiente orientación al núcleo celular (Zhao & Nalwa, 2007). Es importante que estos sistemas sean biocompatibles (tanto íntegros como sus productos de degradación), no deben producir efectos tóxicos, alérgicos o inflamatorios. También deben proteger la actividad del fármaco y mejorar su transporte a través de las barreras biológicas. Si se le añade alguna función específica, también le debe ser posible acarrear el fármaco hasta el sitio en donde el sistema será estimulado por una señal apropiada. Ej.: Iontoforesis.

En el diseño y formulación de nanopartículas es importante considerar diversos aspectos pero los puntos clave que consideramos son: tamaño de partícula, método de encapsulación, estabilidad del fármaco, parámetros de degradación de la matriz y cinética de liberación del fármaco.

En este trabajo prepararemos Nanopartículas a base de polietil cianoacrilatos (PECA) y dióxido de silicio (SiO₂) por lo que a continuación destaco datos importantes de estos dos compuestos.

2.10.4 Nanopartículas de Polietil cianoacrilato (PECA).

Las Nanopartículas de PACA han aparecido como una tecnología establecida en nanomedicina, se han utilizado como acarreadores poliméricos biodegradables y como sistemas de liberación debido a su gran biodisponibilidad, mejor encapsulación, liberación controlada y menores propiedades toxicológicas. El PECA se ha estudiado extensamente como acarreador de diferentes fármacos y ha sido exitoso en el desarrollo de formulaciones nanoparticuladas para administración intravenosa. Por lo que las Nanopartículas de PACA son bien calificadas para investigarse como acarreadores de más principios activos (Radwan, AlQuadeib, Aloudah, & Aboul Enein, 2010) al ser reversibles los efectos de las Nanopartículas de PACA al concluir el tratamiento; estos sistemas se consideran candidatos para uso clínico (Fernandez Urrusono, Fattal, Porquet, Feger, & Couvreur, 1995).

Para el tratamiento del cáncer, se pretende que las Nanopartículas de PACA se apliquen para superar la resistencia múltiple a fármacos "Multidrug Resistance" (MDR) a nivel celular, asociando el principio activo con acarreadores coloidales como Nanopartículas. Así se incrementará la concentración celular del principio activo usando el proceso de endocitosis. Las Nanopartículas de PACA pueden utilizarse para vectorizar fármaco anticancerígeno hacia el hígado, ya que se ha visto que se favorece la captación de éstas por órganos del Sistema Macro – Fagocítico "Macro Phagocytic Sistem" (MPS) (Zhao & Nalwa, 2007).

Se ha demostrado que el ácido policianoacrílico (resultante de la degradación del PECA, Fig. 13) puede formar pares iónicos con el principio activo, provocando un efecto sinérgico. El mecanismo asociado muestra que las nanopartículas se adhieren a la superficie celular para seguir con la liberación del principio activo y la

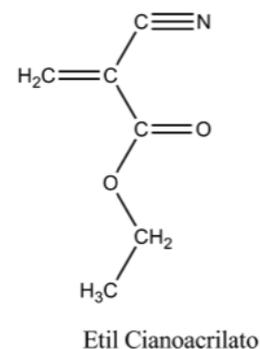


Fig. 11 "Molécula (monómero) de ECA"

degradación de la nanopartícula simultáneamente (Vauthier, Dubernet, Chauvierre, Brigger, & Couvreur, 2003) (C de Vardiere, y otros, 1997) (Radwan, AlQuadeib, Aloudah, & Aboul Enein, 2010) .

Se tienen evidencias de que la estructura de cada PACA va a resultar en un efecto característico de cada uno de ellos, y va a repercutir en la liberación del fármaco así como en la citotoxicidad de éste (Némati, y otros, 1996).

2.10.5 Nanopartículas de SiO₂

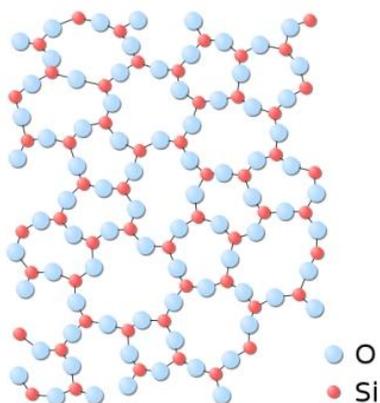


Fig. 12 "Posible arreglo estructural de las moléculas de SiO₂"

Las Nanopartículas de sílice (SiO₂) se están desarrollando ampliamente de acuerdo a su aplicación en la biomedicina. Actualmente se ha propuesto su uso como medio de recubrimiento, pues se logra fácilmente la modificación de superficies, baja toxicidad, funcionalidad y bioconjugación (Minjung, y otros, 2009). La administración intravenosa y/o intraperitoneal de Nanopartículas de sílice en ratones, reveló la acumulación de éstas en cerebro, hígado, bazo, pulmón, riñón, intestino, próstata y testículo; lo que indica una modificación inorgánica de las nanopartículas como un vector potencial muy prometedor para transferencia, terapia génica, y liberación modificada.

Teniendo propiedades de fotoluminiscencia a escala nanométrica, se han desarrollado Nanopartículas de SiO₂ para diagnóstico y escaneo clínico, ya que estas se retienen por más tiempo que las moléculas usualmente marcadas y sus longitudes de onda pueden ser ajustadas (Malsh, 2005).

El progreso que se está llevando a cabo en las diferentes áreas para aplicaciones biomédicas será desarrollada eventualmente para aplicaciones clínicas, por consiguiente se debe plantear el punto de su seguridad (Zhao & Nalwa, 2007); pues para cualquier terapia y vectorización, se necesita que las Nanopartículas tengan un gran tiempo de retención, lo que puede llevar a efectos tóxicos *in vivo* (Minjung, y otros, 2009).

El incremento en la actividad biológica puede tener efectos positivos tanto en actividad antioxidante como en la penetración celular para la liberación controlada, pero también puede tener efectos negativos, tales como la toxicidad y la acumulación no deseada en los tejidos del cuerpo (Zhao & Nalwa, 2007).

2.11 EFECTOS BIOLÓGICOS ASOCIADOS A LA EXPOSICIÓN IN VIVO DE NANOPARTÍCULAS

2.11.1 Interacción

En general, los procesos de interacción de las nanopartículas con las células aún son desconocidos. Una vez que las Nanopartículas alcanzan el torrente sanguíneo, se distribuyen por todo el cuerpo a órganos blanco. La mayoría de la distribución es hacia el hígado, pero también ha sido reportada su acumulación en el bazo, corazón, riñón, médula ósea y testículo.

Después de la captación de las Nanopartículas, el siguiente paso es la internalización celular de acuerdo a sus características fisicoquímicas. Para localizarlas dentro de las células es conveniente su localización *in situ*, por microscopía electrónica (EM) o por Microscopía Confocal.

2.11.1.1 Nanopartículas con Proteínas

Las interacciones entre ambas estructuras pueden presentarse generalmente, a través de la formación de enlaces no covalentes: fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals; éstas deben considerarse como factores en los efectos de las Nanopartículas en sistemas biológicos a niveles moleculares.

Existen resultados que indican la posible correlación entre el efecto asociado al tamaño de la nanopartícula y la proteína; por lo tanto los factores como naturaleza de superficie de la nanopartícula, estructura y longitud espacial de la proteína, etc., son de gran importancia (Zhao & Nalwa, 2007).

2.11.2 Captación de Nanopartículas

El nanotamaño influye mucho en los métodos de captación celular. Debido al tamaño tan pequeño y a su amplia actividad de superficie, las nanopartículas pueden *translocarse* de su punto de entrada original a diferentes tejidos en el cuerpo y pueden atravesar membranas celulares fácilmente para acumularse en distintos tipos celulares y distribuirse de diversas formas tanto en el citosol como el núcleo celular. También se ha observado alteración en la estructura nuclear en las células tratadas con SiO₂, acompañada de deterioro significativo de sus funciones, tales como la replicación y transcripción. Los mecanismos *in vivo* de las Nanopartículas son escasamente definidos (Zhao & Nalwa, 2007).

Numerosos estudios confirman que las nanopartículas pueden entrar rápidamente en diferentes células (epiteliales, endoteliales y líneas neuronales, así como algunas células principales en los sistemas de cultivo). La distribución intracelular de las Nanopartículas es mayoritaria en el citoplasma, pero una pequeña fracción puede entrar en el núcleo. (Zhao & Nalwa, 2007)

Se ha encontrado que la captación celular es proporcional a la exposición a los nanomateriales tanto de nanopartículas de óxidos metálicos como poliméricas. Como resultado, esto puede llevar a respuestas celulares adversas y alterar dramáticamente el mecanismo de captación y toxicidad. La captación celular no se correlaciona con la citotoxicidad para algunas nanopartículas (Sohaebuddin, Thevenot, David, Eaton, & Tang, 2010).

La mayoría de las células tienen la habilidad de captar materiales de una gran variedad de tamaños y formas a través de *endocitosis* mediada por un receptor o por otros procesos. Como los endosomas producidos por esos eventos pueden ser de 50 nm o más grandes, no está claro hasta qué punto la captación celular es controlada por el tamaño físico de las Nanopartículas. Este proceso es importante de caracterizar porque altera las vías en las cuales las Nanopartículas pueden influir en los procesos biológicos, la simple observación no predice la toxicidad aguda (Zhao & Nalwa, 2007). Está bien establecido que los macrófagos fagocitan fácilmente las Nanopartículas que no están vectorizadas en un rango muy alto, y que son mucho más capaces de captación que otras tipos celulares estromales. La ávida captación de Nanopartículas por estas células las hace más

susceptibles a la sobrecarga de partículas y muerte celular, especialmente en el caso de Nanopartículas sin forma esférica, pues tardan más en excretarse que las esféricas (Sohaebuddin, Thevenot, David, Eaton, & Tang, 2010).

Otras investigaciones sugieren que las partículas ultrafinas pueden activar la abertura del canal del ion calcio por un mecanismo que involucre Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).

Los mecanismos de transporte, cohesión y adhesión dependen en gran medida del tamaño de la nanopartícula. Las partículas más pequeñas pueden evadir el sistema reticuloendotelial de forma más efectiva, incrementando su tiempo de vida dentro del cuerpo. Los nanomateriales pueden generar complejos móviles que entren en sitios que normalmente son inaccesibles a las proteínas. Debido al aumento en la reactividad, se pueden presentar reacciones inesperadas que pueden alterar las funciones y propiedades de las células. Todo esto contribuye al potencial tóxico de los nanomateriales (Vinod & Diandra L. , 2007).

2.12 NANOTOXICOLOGÍA

2.12.1 Definición

La Nanotoxicología puede considerarse como la Nanobiología en el ambiente xenobiótico, incluyendo las sustancias en nano – escala, donde las interacciones entre las nanosustancias exogenéticas y sistemas biológicos ocurren a nivel molecular (Zhao & Nalwa, 2007).

Entre más pequeñas son las partículas su volumen es menor, lo que resulta en un gran número de partículas con gran área superficial por unidad de masa y, como consecuencia, la probabilidad de interacciones biológicas entre las nanopartículas y la materia orgánica aumenta (Zhao & Nalwa, 2007).

Numerosos estudios muestran que las partículas en nanoescala producen grandes efectos inflamatorios y citotóxicos, debido a que presentan propiedades magnéticas, electrónicas y estructurales que no corresponden con sus propiedades en macroescala (bulto) en concentraciones equivalentes, esto es debido a la gran área superficial y al mayor número de partículas (Minjung, y otros, 2009). Estas propiedades inusuales complican el determinar la seguridad de los nanomateriales (Labhasetwar & Leslie-Pelecky, 2007).

La misma característica que hace a los nanomateriales tan prometedores es la misma que provoca tantas preguntas importantes sobre su efecto potencialmente tóxico (Labhasetwar & Leslie-Pelecky, 2007), cada vez más pruebas muestran que, especialmente, las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales representan un riesgo potencial para la salud humana (Sohaebuddin, Thevenot, David, Eaton, & Tang, 2010). Es por esto que no podemos decir que un material es “biocompatible” por la naturaleza de los nanomateriales y se deben hacer estudios específicos de los materiales individuales y en combinación.

Mientras que los nanomateriales entran en el cuerpo de forma usual (oral, inhalatoria, en el torrente sanguíneo, a través de la piel), pueden interactuar con los materiales biológicos de forma muy diferente que en su forma homóloga en macroescala. A pesar de que el tamaño es importante, no es necesariamente el único factor relevante; las otras nanocaracterísticas son parámetros que también son importantes para entender la

toxicidad. Esto produce una lista de parámetros más extensa que los normalmente dirigidos en estudios típicos de toxicidad.

Se deben buscar y establecer *índices/biomarcadores* que son sensibles para identificar específicamente el daño biológico causado por Nanopartículas (Zhao & Nalwa, 2007). Los biomarcadores se pueden definir como modificaciones o componentes, estructuras, procesos y/o reacciones que se atribuyen de manera directa o indirecta a la exposición de sustancias xenobióticas.

El establecer y buscar un **biomarcador** que refleje específicamente la nanotoxicidad provocada por cierta Nanopartícula (con nanocaracterísticas específicas) es bastante difícil porque los factores esenciales que dominan la interacción con componentes celulares están en estudio y en muchos casos aún no están claros. Por otro lado, para el propósito de la evaluación de la nanoseguridad, normalmente se necesitan tres tipos diferentes de biomarcadores:

Biomarcador de exposición: Estos consisten en la *medición* de la sustancia xenobiótica o un metabolito de la misma, también puede ser un *efecto* directamente atribuible al xenobiótico que se encuentre dentro del organismo. Estos efectos pueden cuantificarse y considerarse como biomarcadores de exposición (Manahan, 2003). Otros biomarcadores de exposición aplicables a las nanopartículas, podrían ser la estimación de los niveles de exposición a las nanopartículas y su toxicocinética.

Biomarcador de efecto: Dentro de esta categoría de *biomarcadores*, podemos encontrar alteraciones bioquímicas, biológicas ó estructurales de componentes celulares que se producen en consecuencia a la exposición *in vitro* o *in vivo* a estructuras nanoparticuladas. Cuando estas alteraciones se asocian específicamente a una molécula o estructura celular se pueden estimar factores de susceptibilidad inherentes a los organismos expuestos en la fisiología, bioquímica u organización celular atribuidas a la exposición de sustancias tóxicas.

Los Biomarcadores de susceptibilidad: reflejan efectos biológicos (vulnerabilidad diferenciada hacia signos o síntomas) provocados por las exposición a nanopartículas. La exposición puede relacionarse con un incremento o daño al pulmón, inflamación, fibrosis, entre otros efectos. Y podemos correlacionar estas variables así como la *dosis – respuesta y tiempo – respuesta* asociadas a la toxicidad (Zhao & Nalwa, 2007).

Se debe entender la cantidad y el tiempo en el que se retienen Nanopartículas en un organismo así como si existe acumulación. El monitoreo de la biodistribución de forma cuantitativa y el análisis del mecanismo de localización, mejorará nuestra comprensión sobre su eficacia y efectos adversos para usos farmacéuticos (Xie, Sun, Zhong, Shi, & Zhang, 2010). Se estima que una correlación de la interacción *nanoestructura-proteína* con datos toxicocinéticos *in vivo* permite la correlación *estructura-actividad*; esto representa un próximo paso muy importante para la evaluación en Nanotoxicidad.

Desde un punto de vista toxicológico, una evaluación toxicológica de nanomateriales debería incluir: reacciones alérgicas y tóxicas, carcinogénesis, toxicidad reproductiva y de desarrollo, mutagénesis y toxicidad genética e idiosincrasia; también efectos reversibles toxicológicos, toxicidad local y sistémica. (Zhao & Nalwa, 2007)

2.12.2 Estado del arte

2.12.2.1 Toxicidad de las Nanopartículas de Polietil cianoacrilato (PECA)

Las nanopartículas son acarreadores submicrónicos y esféricos fabricados de polímeros, los cuales deben ser idealmente biodegradables. Estos sistemas proveen *vectorización tejido – específico* (Fernandez Urrusono, Fattal, Porquet, Feger, & Couvreur, 1995). Entre los nanodispositivos para acarreamiento, las nanopartículas de PACA se han establecido como tecnología para nanomedicina coloidal (Nicolas & Couvreur, 2009). La administración intravenosa de nanopartículas cargadas con principio activo de PACA, es seguida por una rápida captación de los tejidos, en su mayoría por las células de Kupffer (Vauthier, Dubernet, Chauvierre, Brigger, & Couvreur, 2003) del sistema reticuloendotelial; aunque los hepatocitos no son responsables de la captación de Nanopartículas directamente, la liberación del fármaco y/o los productos de degradación del polímero de las células de Kupffer provocan daño en las células parenquimales *in situ*. Se ha encontrado que los efectos provocados por estas nanopartículas son reversibles, cuando el tratamiento concluye (Fernandez Urrusono, Fattal, Porquet, Feger, & Couvreur, 1995).

Las Nanopartículas endocitadas terminan en los lisosomas donde son degradadas por enzimas esterases. La mayor vía de degradación es la hidrólisis de la cadena ester lateral, que termina en la producción de *ácido policianoacrílico* y *alcohol*. Los productos de degradación minoritarios son *formaldehído* y *cianoacetato* (Fig. 36, página 69) (Fattal, Peracchia, & COUV, 1997).

Estudios recientes han mostrado la inducción de toxicidad hepática *in vitro* e *in vivo* asociada a la exposición de nanopartículas. Con el experimento *in vivo*, se encontró una rápida captación por los órganos del sistema reticuloendotelial, principalmente el hígado. (Zhao & Nalwa, 2007) (Fernandez Urrusono, Fattal, Porquet, Feger, & Couvreur, 1995). Al comparar el comportamiento de las Nanopartículas *in vivo* e *in vitro*, se observa que el daño citotóxico *in vitro* no es relevante, en tanto que los resultados *in vivo* sugieren que otros sistemas fisiológicos relevantes, tales como las células sanguíneas circulantes, hormonas séricas, o ambas, son necesarias para causar hepatotoxicidad.

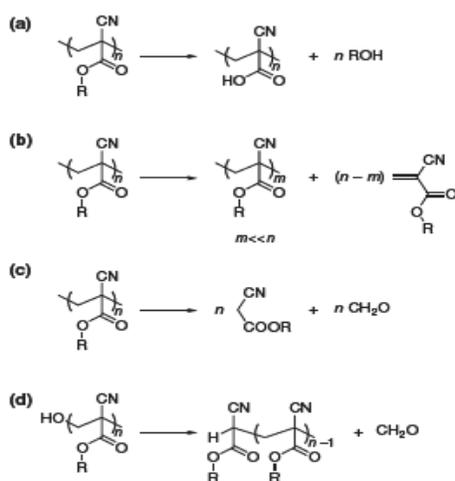


Fig. 13 "Posibles vías de degradación para los polímeros de PACA: a) hidrólisis del grupo ester, b) reacción de depolimerización "unzipping", c) reacción de condensación inversa de Knoevenagel y d) liberación de formaldehído de la hidrólisis del grupo α -hidroxil (Nicolas & Couvreur, 2009) (Fattal, Peracchia, & COUV, 1997)".

Se deben medir parámetros específicos de daño hepático; aunque en estudios previos, las pruebas *in vivo* no concluyeron en efectos citotóxicos, otros estudios *in vitro*, demostraron lo contrario. La falta de sensibilidad de los parámetros sanguíneos en las pruebas *in vivo*, así como el tiempo de vida tan corto de los cultivos celulares puede provocar que se subestimen sus efectos toxicológicos (Fernandez Urrusono, Fattal, Porquet, Feger, & Couvreur, 1995).

Estos efectos se deben principalmente a la interacción que tienen con las células y los organelos de éstas, alterando su funcionamiento “normal”. Se observó que las Nanopartículas de PACA inducen que el nivel de ácido α 1-glicoproteico (AGP) secretado aumente, mientras que el de albumina disminuya en las células de hígado de rata, los cuales son signos de inflamación, lo que se asocia estrés oxidativo. Los radicales libres de oxígeno (ROS) generados durante este proceso pueden inducir lipoperoxidación (afectando principalmente a la membrana celular), oxidación de proteínas y alteración del ADN.

Aún no se sabe exactamente el mecanismo citotóxico de las Nanopartículas ya que puede ser que íntegra interactúe con lo anterior mencionado, o que sean sus productos de degradación los causantes de toxicidad. Fernandez Urrusona et. Al y colab. (1995) realizaron pruebas en hepatocitos y células de Kupffer *in vitro* con los productos de degradación de Nanopartículas de PACA, y observaron que éstos son menos tóxicos que las Nanopartículas íntegras, pues las alteraciones en la síntesis de proteínas asociadas a su administración solo se observaron cuando los hepatocitos estuvieron en contacto directo con las Nanopartículas (Vauthier, Dubernet, Chauvierre, Brigger, & Couvreur, 2003). Estos efectos pueden ser reversibles después de 15 días de tratamiento. Debe tomarse en cuenta que los productos de degradación van a tener un comportamiento distinto, ya que su solubilidad, y distribución serán característicos de las moléculas.

2.12.2.2 Toxicidad de Nanopartículas de Dióxido de Silicio (SiO₂)

Las nanopartículas de sílica son ejemplos de nanoestructuras sin una clara indicación de degradación *in vivo* (Ballou, Langerholm, Ernst, Bruchez, & Waggoner, 2004) (Singh, Pantarotto, L, Pastorin, Klumpp, & Prato, 2006) (Yang, Chang, Wu, Tsai, Wang, & Kuo, 2007).

Pensando en el debate biomédico sobre su seguridad, es importante entender la cinética y toxicidad *in vivo*, asociada a las Nanopartículas de SiO₂, como de los nanomateriales recubiertos con sílica. Se ha reportado que la exposición a este tipo de nanopartículas lleva a un daño a la membrana plasmática (Sohaebuddin, Thevenot, David, Eaton, & Tang, 2010), inducen respuestas pro – inflamatorias como la liberación de IL-1 β y α -TNF y su elevación en la concentración sanguínea después de una sola administración intraperitoneal hasta su disminución total gradualmente a través del tiempo (Minjung, y otros, 2009). Una administración intravenosa mostró que estas Nanopartículas se acumulen principalmente en hígado, bazo (la mayoría captadas por macrófagos) y pulmones; tal vez la vía de entrada a las células es por endocitosis y la inmersión de los fagosomas (Xie, Sun, Zhong, Shi, & Zhang, 2010).

2.12.3 Toxicocinética de Nanopartículas

El poder toxicológico de las Nanopartículas puede entenderse mejor si estudiamos la capacidad que presentan para absorberse, distribuirse, si es el caso metabolizarse y excretarse en organismos expuestos. En la toxicodinamia nos permitirá entender el mecanismo de toxicidad asociado y podremos correlacionar estos

parámetros con los efectos observados quizá en un órgano o célula blanco (Minjung, y otros, 2009). Durante su distribución, las nanopartículas pueden escapar de las defensas fagocíticas normales y modificar la estructura y función de proteínas. Aunque el material de composición afecta la viabilidad celular, aún no está claro si esto afecta la cinética de muerte celular (Sohaebuddin, Thevenot, David, Eaton, & Tang, 2010).

La adsorción de proteínas séricas puede ser uno de los factores que lleven a la variación en las respuestas celulares y los resultados toxicológicos, porque una vez que las proteínas son adsorbidas en la superficie de las Nanopartículas, pueden provocar cambios conformacionales. Esto puede causar la exposición de nuevos *epitopos* que accidentalmente sean reconocidos por proteínas de señalización intracelulares e inducir diversas vías de señalización. Estos efectos también puede afectar la asociación de los nanomateriales con la membrana celular y su captación.

Resultados del seguimiento toxicocinético de Nanopartículas de sílica en ratones administradas por vía intravenosa, mostraron que éstas son eliminadas por orina y bilis mismas que son atrapadas por macrófagos en el bazo e hígado. Su permanencia se detectó hasta 4 semanas después de una sola administración (Minjung, y otros, 2009). Las Nanopartículas de SiO₂ se captaron ampliamente en células bronquiales *in vitro* (Sohaebuddin, Thevenot, David, Eaton, & Tang, 2010).

Las Nanopartículas sin recubrir son rápidamente opsonizadas y removidas por los macrófagos en el hígado (células de Kupffer), bazo, pulmones y médula ósea, que pertenecen al Sistema Reticulo Endotelial “Reticuloendothelial System” (RES) (Kreuter, 2007). Hay evidencias que muestran que las demás nanopartículas, se concentran en el hígado y el bazo, en comparación con el fármaco libre. Esto ha permitido el tratamiento de enfermedades tales como infecciones intracelulares o metástasis hepática (Fernandez Urrusono, Fattal, Porquet, Feger, & Couvreur, 1995). Varios investigadores han demostrado que el recubrimiento de algunas nanopartículas puede prolongar la circulación sanguínea y reducir la captación del hígado (Vauthier, Dubernet, Chauvierre, Brigger, & Couvreur, 2003).

El único factor puede limitar su aplicación en terapia y diagnóstico médico es su probable potencial toxicológico.

2.12.3.1 Absorción de las Nanopartículas *in vivo*

Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas se han asociado con los efectos biológicos y sus capacidades tóxicas en órganos blanco. La concentración efectiva y circulante, depende de muchos factores incluyendo la dosis de exposición, su capacidad para ser adsorbidas, el tipo de distribución y excreción en el organismo, enlaces e interacciones con macromoléculas y la probabilidad de su acumulación en los sitios blanco.

Hay evidencias que muestran que el tamaño que alcanzan las nanopartículas en los órganos expuestos, también depende del microambiente *in vivo* existente. Factores como el pH compartamentalizado celular así como la concentración intrínseca de iones pueden fomentar la agregación de las nanopartículas modificando los parámetros toxicocinéticos (Zhao & Nalwa, 2007).

2.12.3.2 Distribución de las Nanopartículas

Los estudios sobre localización y distribución ayudan a entender el comportamiento de las nanopartículas una vez que entran al organismo.

La biodistribución resulta de las defensas naturales del organismo hacia partículas extrañas, incluyendo un fenómeno de reconocimiento no específico. La opsonización de las Nanopartículas por proteínas sanguíneas y la



Fig. 14 "Posibles factores que afectan la translocación y distribución de las Nanopartículas in vivo"

activación del complemento es un fenómeno que apoya su captación por los macrófagos (Vauthier, Dubernet, Chauvierre, Brigger, & Couvreur, 2003).

2.12.3.2.1 Efecto de los factores de Translocación y Distribución de Nanopartículas

La mayoría de los estudios de toxicidad *in vivo* para nanopartículas hasta el momento destacan la exposición por vía aérea. Aunque en este caso el primer impacto es en el sistema pulmonar, la *translocación* de nanopartículas lleva al acceso a la circulación y permite la distribución por todo el cuerpo. La translocación es muy dependiente de las propiedades específicas de las nanopartículas. Muchos nanomateriales translocan al hígado, con una captación secundaria al bazo, médula ósea, riñón, vejiga y corazón. Las nanopartículas que

migran al corazón pueden afectar y producir arritmia y coagulación (Vinod & Diandra L. , 2007).

Las moléculas lipofílicas, penetran la membrana celular por sí sola; pero las moléculas muy polares y los iones de tamaño moderado, ocupan mecanismos de transporte especiales. Las nanopartículas por su parte, una vez dentro del organismo son rodeadas de una capa de hidratación, aumentándolas de tamaño, de esta forma, aparentemente difunden a través de los canales y poros acuosos de la membrana celular.

A pesar de que estos canales y poros son muy pequeños, las *nanocaracterísticas* juegan un papel importante en este proceso y son factores decisivos que marcan la *biodistribución* de las nanopartículas (Zhao & Nalwa, 2007).

2.12.3.3 Excreción de las nanopartículas

Todos las sustancias son eliminadas por varias rutas, el órgano más importante es el riñón, la siguiente forma más importante de eliminación son las heces y excreción biliar, por lo que se piensa que estas vías también pueden ser las principales para las Nanopartículas. Es importante considerar que las nanopartículas no metabolizadas son eliminadas del cuerpo por vía fecal y eventualmente ser liberadas al medio ambiente; por lo que la importancia de su potencial tóxico permite conocer y aclarar rutas de excreción y efecto nanotóxico directo e indirecto en seres vivos (Zhao & Nalwa, 2007).

La depuración renal de materiales nano sólidos es afectado por el tamaño de partícula y la carga superficial; el estado de agregación de las Nanopartículas es un factor importante para la distribución y excreción del cuerpo (Minjung, y otros, 2009).

En un estudio las partículas más pequeñas de SiO₂ existen en mayor concentración en orina y heces y son eliminadas rápidamente vía bilis, en comparación con las partículas más grandes (Minjung, y otros, 2009).

2.12.4 Toxicodinamia

Viéndolo desde el punto de vista de la Nanotoxicidad, la Toxicodinamia sería el efecto que tienen las Nanopartículas en los diferentes sistemas, órganos, tejidos y células durante su interacción; entre estos efectos se pueden mencionar *inducción de estrés oxidativo*, la *inducción de eventos genotóxicos*, los efectos moduladores en la producción de *citoquinas inflamatorias* y *apoptosis*, entre otros eventos.

Las reacciones tóxicas se clasifican en enlaces no covalentes, covalentes, atracción de H⁺ (radicales libres), transporte de electrones, y reacciones enzimáticas. Las nanopartículas como xenobióticos, pueden unirse con moléculas blanco y resultar en disfunción celular. El paradigma generalmente aceptado para iniciar los efectos patogénicos es el *estrés oxidativo*, generar Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), con propiedades reactivas en biomoléculas se han asociado a modificaciones en las funciones celulares habituales como la inflamación y alteraciones en la expresión de genes entre otras actividades celulares adversas (Zhao & Nalwa, 2007).

2.12.4.1 Órganos blanco para toxicidad causada por nanopartículas

Cada órgano tiene distinta composición, estructura y función; por lo que cada nanopartícula puede tener su forma particular de generar toxicidad en cada órgano blanco de los organismos y dependerá de las rutas de exposición de los individuos.

2.12.4.2 ERO y Radicales Libres

Como uno de los principales mecanismos de toxicidad asociados a los nanomateriales más importante, es la inducción de radicales libres (Sohaebuddin, Thevenot, David, Eaton, & Tang, 2010).

Las *especies reactivas del oxígeno* (ERO) son radicales de oxígeno y derivados no radicales del oxígeno molecular.

- **Radicales de oxígeno:** radical superóxido (O₂⁻), radical hidroxilo ([•]OH), Oxígeno singulete (¹O₂).
- **Derivados no radicales del oxígeno molecular:** peróxido de hidrógeno H₂O₂, ácido hipocloroso (HClO), ozono (O₃) y peroxinitrito (ONOO⁻) (Zhao & Nalwa, 2007).

El electrón desapareado de las ERO, les proporciona una configuración espacial que los hace altamente inestables, extraordinariamente reactivos y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos con las biomoléculas: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Rodríguez Perón, Menendez López, & Trujillo López, 2001).

Un aumento en el grado de generación de ERO causa *estrés oxidativo* y desencadena respuestas inflamatorias (Vinod & Diandra L. , 2007). Este desequilibrio celular se ha asociado con la transformación celular y cáncer. Los altos niveles de estrés oxidativo perturban el poro PT mitocondrial y alteran la transferencia de electrones, lo que puede producir apoptosis o necrosis. La inducción de ERO representa el mecanismo clave para estudiar los efectos inducidos por las Nanopartículas. El estudio de su producción por la superficie de la partícula se considera dentro de los efectos celulares asociados a su reactividad.

En condiciones fisiológicas normales existe un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes. Bajas concentraciones de ERO estimulan el crecimiento de las células, funcionan como señales que determinan respuestas fisiológicas de adaptación al medio ambiente. Las ERO son indispensables para la diferenciación y muerte celular programada (apoptosis).

Oxidantes \leftarrow \rightarrow Antioxidantes

El *estrés oxidativo* es una situación de **desequilibrio** con aumento de oxidantes o con una disminución de antioxidantes de forma progresiva y continua. Los antioxidantes presentan respuestas adaptativas lo que le confiere elasticidad y reversibilidad a la situación biológica. El estrés oxidativo no es sinónimo de daño celular, ya que hay varios eventos fisiológicos que requieren un aumento en el consumo de oxígeno (ej. Mitosis), generándose un estrés oxidativo temporal o adaptativo, y es compensado con el aumento en la actividad de los sistemas antioxidantes.

La palabra *stress* se refiere a un síndrome general de adaptación, el cual es de gran aplicación en fisiología por los efectos reguladores normales que se extienden a efectos tóxicos por la hiperactivación del eje hipotálamo – hipófisis – suprarrenales.

Por ello, se distingue entre **estrés oxidativo como reversible**, y **daño oxidativo como irreversible**. De este modo, de acuerdo a la concentración y duración en el fenómeno oxidativo (severidad del cambio redox celular) se puede conducir a la célula de un estado funcional basal, pasando por un proceso fisiológico o adaptativo, hasta la muerte celular por apoptosis o necrosis.

Se debe tener en cuenta que los intermediarios que se forman en las reacciones bioquímicas en cadena mediadas por radicales libres son especies de rápido recambio, muy reactivas e inestables. El estrés oxidativo intracelular es una situación en la que el aumento de la concentración en estado estacionario de uno de los intermediarios incrementa la velocidad de la reacción en cadena y el consumo de antioxidantes endógenos. (Konigsberg Fainstein, 2008)

En general todo factor que disminuya la eficiencia en el acoplamiento de la cadena de transporte de electrones incrementa la producción de superóxidos.

2.12.4.3 Lípidos

Las grasas una vez que entran en el organismo son transportadas como lipoproteínas, una de sus principales funciones es formar parte de la membrana. Los ácidos grasos en las células animales tienen de 14 a 24 átomos de carbono, y sus dobles ligaduras están en forma *cis*. El principal fosfolípido es la lecitina.

2.12.4.3.1 Lipoperoxidación

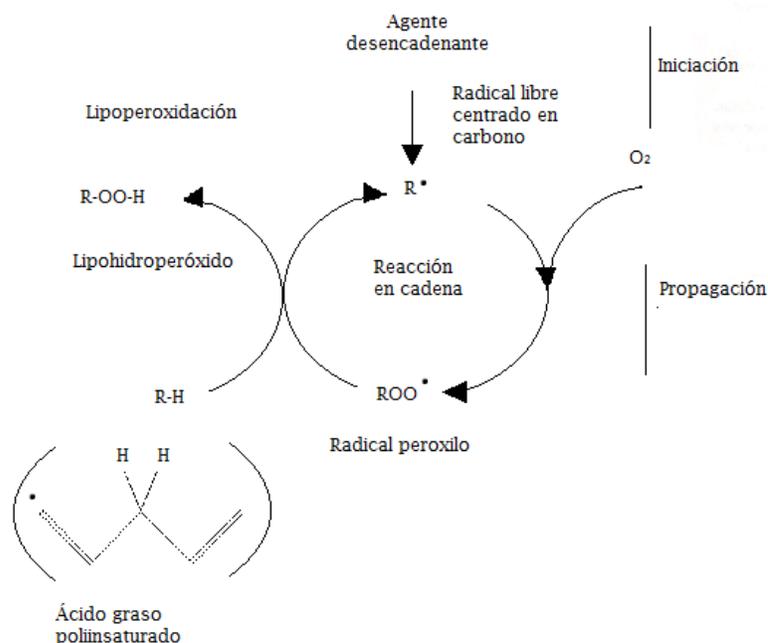


Fig. 15 "Oxidación de los lípidos iniciada por la abstracción de un átomo de hidrógeno, lo que genera un radical libre centrado en carbono (Konigsberg Fainstein, 2008)"

Los PUFA "poliunsaturated fatty acids" (ácidos grasos poliinsaturados) son más susceptibles a la oxidación con el radical hidroxilo ($\bullet OH$) que los saturados y monoinsaturados. La lipoperoxidación (Fig. 15) puede determinarse por la cantidad de dienos conjugados, por los carbonilos formados, por ejemplo malondialdehído (MDA), o por fluorescencia.

Los productos de la lipoperoxidación: 4-Hidroxinonenal "4-HNE" y malondialdehído "MDA" estimulan la fibrosis, la cual aumenta en la medida en que disminuye la inhibición por retroalimentación de la síntesis de colágena, debido a que el acetaldehído forma aductos con el extremo carboxi terminal del propéptido de procolágena (Konigsberg Fainstein, 2008).

El daño a las funciones celulares normales ocurre durante la formación de ERO, la peroxidación lipídica y el subsecuente daño a la membrana (Fig. 16) (Zhao & Nalwa, 2007). Este daño puede ser estimado por diferentes métodos analíticos. Cuantitativos y semicuantitativos. En este trabajo de tesis evaluaremos la capacidad de las nanopartículas de inducir un incremento en la lipoperoxidación celular.

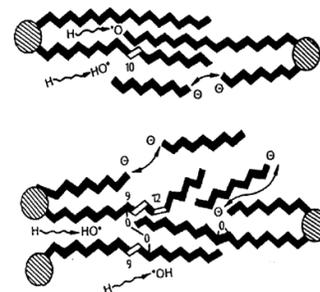
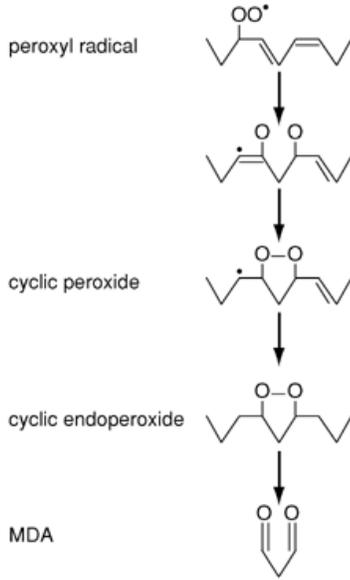


Fig. 16 "Daño producido por los Radicales Libres a los fosfolípidos de las membranas celulares. Los Radicales libres se fijan en diversos puntos de las cadenas y las "puentean", las desorganizan y las rompen" (Castillo, 2001)

2.12.4.3.1.1 TBARS (Especies Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico)

El ensayo de TBARS se ha utilizado para medir la lipoperoxidación mediada por radicales libres y estrés oxidativo. El TBA (ácido tiobarbitúrico) reacciona con aldehídos de la lipoperoxidación, tal como el MDA, es el método más común para la evaluación de la peroxidación lipídica en muestras biológicas. (Lapenna, Ciofani,

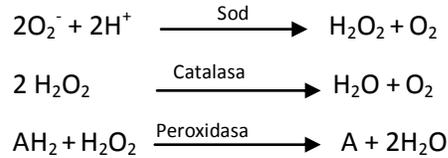


Pierdomenico, Giamberardino, & Cucurullo, 2001). Los precursores endoperoxidados del MDA se forman debido a la inducción de los radicales de la lipoperoxidación y de la biosíntesis de eicosanoides enzimáticos (a. araquidónico). La cuantificación de MDA da una idea del daño causado por el estrés oxidativo. Es un parámetro importante de lipoperoxidación.

Para medir la peroxidación lipídica, se deben tomar en cuenta la iniciación, propagación y la terminación de las reacciones. Si se forman radicales de carbono inestables a partir de los ácidos grasos, se generan dienos conjugados como siguiente grupo de intermediarios; se forman tanto radicales peroxilo e hidroperóxidos lipídicos. De estos compuestos, como producto secundario de lipoperoxidación, se forma el malondialdehído (Fig. 18) (Siems & Grune, 2005).

Fig. 17 "Formación de MDA por la reacción de un radical peroxilo con los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)".

2.12.5 Mecanismos Antioxidantes



(Jiménez & Merchant, 2003)

Los antioxidantes actúan protegiendo los PUFA de la peroxidación lipídica y además preservando la estructura de la membrana celular intacta, por lo tanto su papel es crítico al mantener las funciones de los organismos (Zhao & Nalwa, 2007).

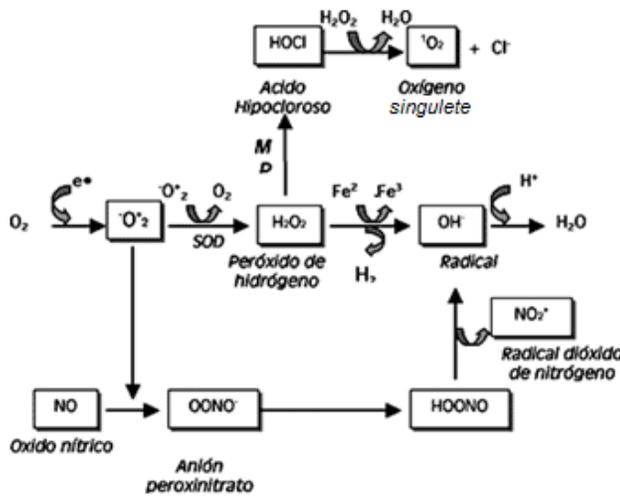
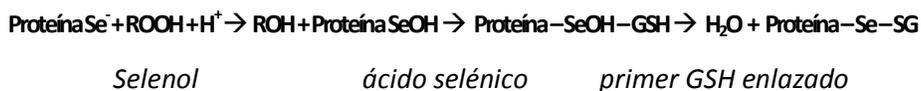


Fig. 18 "Generación de ERO; MP, mieloperoxidasa; SOD, superóxido dismutasa" (Castillo, 2001)

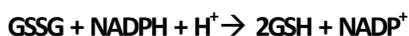
2.12.5.1 Glutati3n (GSH)

El sistema de Glutati3n (GSH, glutati3n reducido y GSSG, glutati3n oxidado), es central para la reducci3n de H₂O₂ y/o per3xidos lip3dicos, siendo la GPx (selenoprote3na) la responsable, junto con la oxidaci3n del GSH.

El GSH es un trip3ptido con un grupo tiol (-SH) con capacidad antioxidante. Esta mol3cula detoxifica radicales libres y toxinas ex3genas, mantiene el equilibrio oxido - reducci3n intra y extracelularmente.

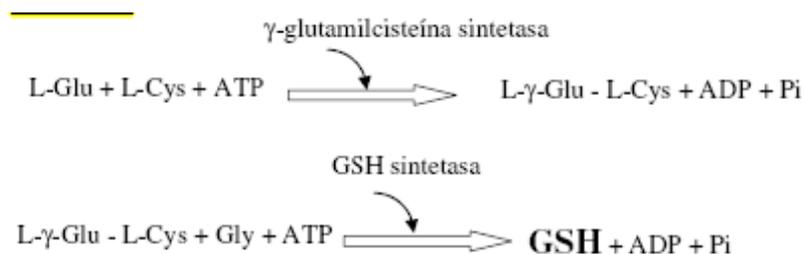


La mol3cula de GSSG formada, en seguida se reduce por la enzima glutati3n reductasa (intracelular), utilizando NADPH como cofactor



Se ha observado que existe un r3pido incremento de GSH intracelular en respuesta al estr3s oxidativo. Otras respuestas a esto incluyen el transporte de GSH al interior celular y exportaci3n de GSSG, acumul3ndose este 3ltimo en el citosol. (Konigsberg Fainstein, 2008)

2.12.5.1.1 S3ntesis de Glutati3n



El equilibrio de esta s3ntesis se obtiene por retroalimentaci3n negativa de la enzima γ -GCS (Baxterretxea, 2006).

2.12.5.1.2 Funciones

El GSH y sus enzimas relacionados, por su capacidad reductora y antioxidante, se encuentran implicados fundamentalmente en la:

Proliferaci3n celular: ayuda en el control del ciclo celular interviniendo en la s3ntesis y reparaci3n de ADN y prote3nas, as3 como en el transporte de amino3cidos.

Protecci3n celular: frente a los radicales libres, compuestos t3xicos end3genos y ex3genos, agentes carcin3genos, as3 como en la defensa celular; mantiene la integridad de los componentes lip3dicos, prote3nicos y lisosomales.

Homeostasis del Ca²⁺: la liberaci3n del Ca²⁺ mitocondrial depende principalmente de la oxidaci3n de NADPH, la movilizaci3n de los dep3sitos de Ca²⁺ del ret3culo endoplasm3tico depende del estado redox de los residuos sulfhidrilo.

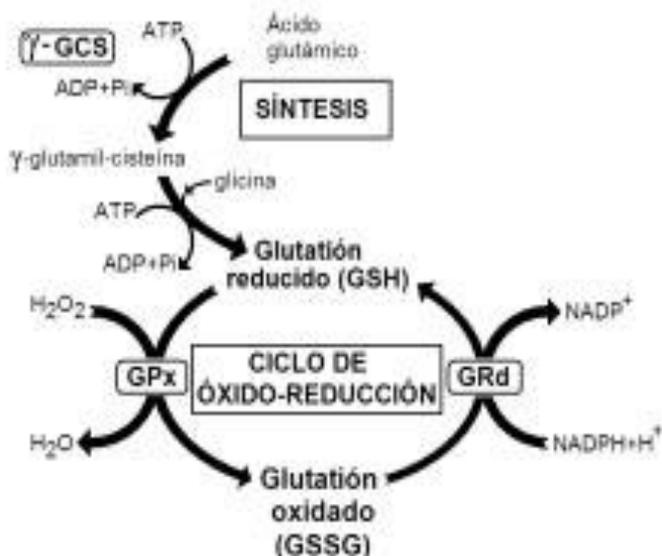


Fig. 19 "Ciclo del GSH; la actividad GPx está regulada por la concentración de sus sustratos, mientras que los niveles de GSSG posiblemente a una mayor actividad de la GPx; regulan la actividad de la GRd. El estado redox celular y la relación GSH/GSSG participan en la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de enzimas antioxidantes" (Ramírez, Reyes, Liberona, Bustamente, Sáez, & Gisella, 2007)

2.12.6 Citotoxicidad

2.12.6.1 Definición

La citotoxicidad se puede definir como el estudio de las alteraciones celulares que comprometen la viabilidad, estructura y función celular.

Los agentes citotóxicos son, en la mayoría de los casos, potenciadores de apoptosis. Los agentes citotóxicos terapéuticos actúan en su mayoría en la división rápida celular, como es el caso de las células cancerígenas y los linfocitos T y dan como resultado actividad inmunosupresiva y antiinflamatoria (Zhao & Nalwa, 2007).

La apoptosis no solo puede reflejar la defensa del organismo en contra de una infección, sino también una respuesta a otra forma de estrés celular tal como calor, oxidación y desdoblamiento de proteínas.

Hay evidencias que muestran que las células expuestas a Nanopartículas de SiO₂ muestran la activación de caspasa, pero difieren los caminos sugeridos para la activación de apoptosis. Un estudio dice que la desestabilización lisosomal es el factor inicial, mientras que otros concluyen que es la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial la principal causa de muerte celular. De hecho, puede que ambos eventos estén relacionados. Se ha asociado que la citotoxicidad provocada por Nanopartículas de SiO₂ con la reducción del potencial de membrana mitocondrial (Sohaebuddin, Thevenot, David, Eaton, & Tang, 2010).

Idealmente la citotoxicidad de las Nanopartículas podría ser manipulada para propósitos terapéuticos, por ejemplo, induciendo muerte celular en células cancerígenas mientras mantienen sanas a las células normales.

En la preparación de Nanopartículas como un sistema de liberación con principios activos citotóxicos, y como sistema de acarreamiento, el vehículo (Nanopartícula) no debe ser citotóxico.

Las alteraciones en las funciones normales de la mitocondria afectan de una forma u otra las funciones celulares, si consideramos a este organelo la principal maquinaria de energía intracelular producto de la respiración oxidativa. Su sensibilización se asocia a eventos neurotóxicos o activación de la apoptosis después de la exposición a nanopartículas iniciando la muerte celular.

2.12.6.2 Pruebas in vivo (fundamentos y consideraciones generales)

2.12.6.2.1 GSH

El GSH interviene en las reacciones de reducción de los radicales libres que se forman durante las reacciones oxidativas normales de la célula. Cuando ésta experimenta estrés oxidativo, las concentraciones normales tienden primero a aumentar para balancear este desequilibrio. Cuando los radicales libres exceden las concentraciones de GSH, éste último comienza a disminuir y es cuando se lleva a cabo el *daño oxidativo*.

El GSH reacciona con el OPT formando un complejo fluorescente que es cuantificable por fluorescencia a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión a un pH de 8. (Hissin & Hilf, 1976). Es en este pH donde el OPT es selectivo para GSH y no reacciona con el GSSG. Una muestra del sobrenadante se diluye en PBS, pH 8 (100 µL sobrenadante de tejido en 2 mL totales, y 50 µL de plasma en 1.5 mL totales). Toda la manipulación de las muestras se realiza en hielo para evitar al máximo la oxidación del GSH *ex vivo* y el OPT se encuentra en exceso en el sistema. La cuantificación se realiza en oscuridad total. Este método permite realizar cuantificaciones en muestras con concentraciones muy pequeñas a una alta confiabilidad.

2.12.6.2.2 TBARS

El ensayo de TBARS se ha utilizado en investigación clínica para medir la lipoperoxidación mediada por radicales y estrés oxidativo debido a su sencillez y sensibilidad.

El método de TBARS, es rápido y confiable, tiene un límite de cuantificación de 1 nmol MDA/1L de plasma. Se basa en la cuantificación del aducto formado entre el ácido tiobarbitúrico y el MDA (Fig. 20) que forma un cromógeno rosado y tiene un máximo de absorción entre 532 y 535 nm para correcciones algunos autores usan las diferencias entre medidas a absorbancias entre 535 y 520 nm (Siems & Grune, 2005).. Para su formación se calienta la muestra a 90 °C a un pH bajo.

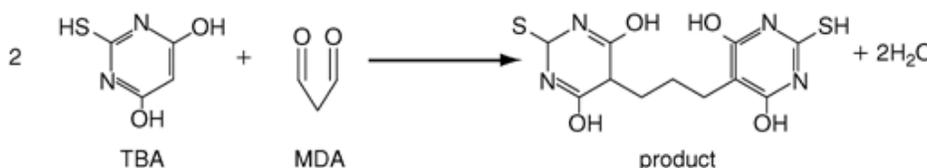


Fig. 20 "Reacción del TBA con MDA"

Una de las desventajas de este método es que no solo se forman aductos con MDA, por lo que normalmente el valor obtenido es subestimado (Siems & Grune, 2005).

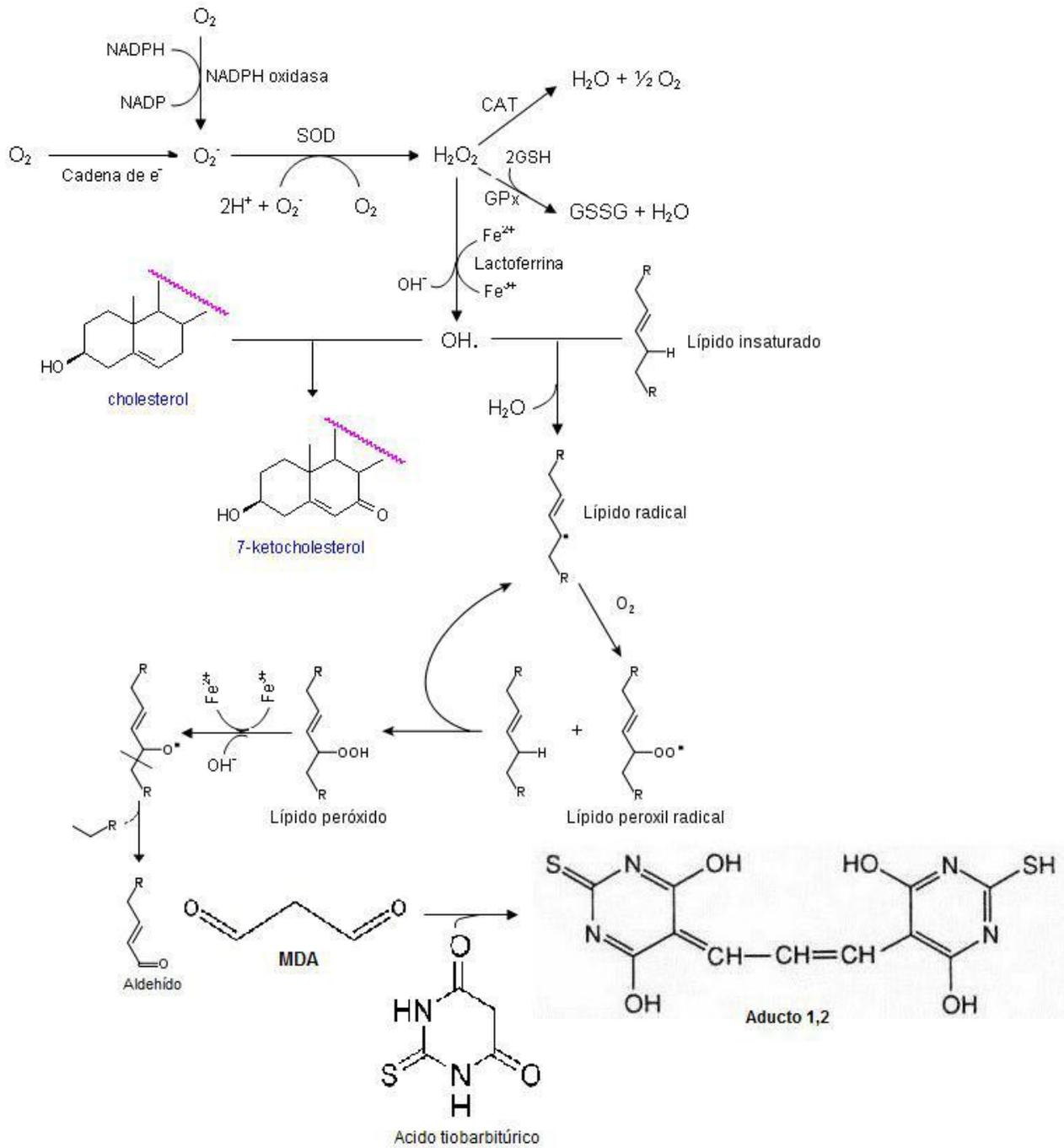


Fig. 21 "Interacción del GSH en la reducción de H₂O₂ y formación de MDA como producto de la lipoperoxidación, éste reacciona con el TBA formando el aducto 1,2 que absorbe a una λ de 540 nm" (Gasca Zacarías, 2011)

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente el desarrollo de nanopartículas para sus diversas aplicaciones en la industria está en auge, la nanoingeniería busca materiales, procedimientos, tensoactivos, medios, principios activos, materiales para recubrimiento; variables como temperaturas, condiciones de agitación, métodos de purificación... todo con el fin de obtener nanopartículas de tamaños de partícula condicionados, potenciales z, estabilidad, etc.; pero dentro de todas estas consideraciones no se toma en cuenta que cada factor/variable añadida a la elaboración de estas nanopartículas le va a conferir propiedades únicas que radican en sus propiedades fisicoquímicas influyendo en su comportamiento biológico (efecto / potencial citotóxico). De aquí la importancia de la nanocaracterización, al mencionar esta palabra en primera instancia se piensa en las propiedades físico - químicas de las nanopartículas, sin embargo, también deben considerarse evaluación cito y genotoxicidad: Nanotoxicidad.

La evaluación citotóxica de cada tipo de nanopartícula es indispensable para determinar el efecto del tiempo de exposición, dosis y todos los parámetros toxicológicos que se consideran para los diversos materiales; pues erróneamente se piensa que las propiedades toxicológicas de un material en “bulto” (bulk material) van a ser las mismas a escala nanométrica.

Al ser tan amplio el campo de aplicación de las nanopartículas, estos parámetros son indispensables en cuestiones de seguridad para los seres vivos que estén en contacto directo o indirecto con ellas.

Desde el punto de vista farmacológico, el desarrollo de Nanopartículas para el acarreamiento de fármacos es un tema bastante amplio, que, para la obtención de óptimos resultados, se debe complementar con diferentes pruebas y evaluaciones que pueden y/o deben incluir ensayos multidisciplinarios; todo esto con el fin de tener un pleno conocimiento del mecanismo de distribución y comportamiento de cada material a escala nanométrica.

Se han realizado numerosos estudios con Nanopartículas para entender su captación, interacción, liberación de fármacos (en el caso de acarreadores) y viabilidad en distintas líneas celulares, ya que los estudios *in vitro* son más rápidos, prácticos y abren un panorama bastante amplio... sin embargo, estos estudios deben complementarse con modelos *in vivo*, que demuestren comportamientos cinéticos y que ayuden a entender mecanismos de absorción, distribución, biotransformación y eliminación de las Nanopartículas.

Se sabe que los organismos tienen diferentes comportamientos (idiosincrasia), y que tienen la capacidad de “adaptación” es por esto que no podemos basar la seguridad de un nanomaterial en los resultados que arroja solo el sistema *in vitro*.

Lo ideal sería que en los estudios de Nanotoxicidad, se realicen pruebas *in vivo* / *in vitro* a la par, para que a la larga se pueda encontrar una forma de correlación y con esto asegurar que las pruebas *in vitro* realmente confirmen los resultados de seguridad.

En este trabajo se estudiará el efecto citotóxico asociado al estrés oxidativo producido por la administración de sistemas simples de SiO₂ y PECA, así como el de sistemas híbridos de éstos, donde se varió el orden y tiempo de adición entre los materiales SiO₂ y PECA, se establecerá el potencial citotóxico de cada material así como la importancia de delimitar que cada efecto es independiente de cada sistema nanoparticulado con propiedades fisicoquímicas individuales; que puedan adoptar los sistemas híbridos.

4 OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Evaluar la citotoxicidad asociada al estrés oxidativo inducida por diferentes sistemas nanoparticulados fabricados a base de Polietil cianoacrilato (PECA) y Dióxido de Silicio (SiO₂) en ratas Wistar.

4.2 PARTICULARES

- Fabricar sistemas nanoparticulados únicos e híbridos a base de SiO₂ y PECA.
- Caracterizar las nanopartículas obtenidas de acuerdo a su tamaño de partícula, potencial Z, Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
- Establecer un diseño experimental para el estudio de la Citotoxicidad asociada al estrés oxidativo dosis – efecto en ratas Wistar macho jóvenes de entre 120 y 180 g de peso.
- Estimar la cantidad de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y glutatión reducido (GSH) en hígado, riñón y plasma de ratas Wistar macho expuestas a las nanopartículas en estudio.
- Analizar la citotoxicidad asociada al estrés oxidativo inducida en ratas Wistar macho expuestas a las nanopartículas en estudio y conocer si existe alguna relación con sus características fisicoquímicas.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 APARATOS Y EQUIPOS

| | |
|---|---|
| Agitador mecánico y Homogeneizador: MixerLab - Homogenizer Glas-Col Variable Speed Reversible | Orbital Shaker: MRC |
| Balanza analítica: Sartorius BL 120S | Potenciómetro: OAKTON PH 510 SERIES PH/MV/°C METER |
| Campana de flujo laminar: CFV-90, INDUSTRIAS FIGUESA | Ultracentrífuga: BECKMAN – COULTER, MICROFUGE 222 CENTRIFUGUE |
| Dry Bath: MRC | Ultrasonido: ULTRASONIC PROCESSOR MOD. CPX 130 COLE PARMER |
| Equipos de filtración: | Vortex: 2 GENE SCIENTIFIC INDUSTRIES LABNET |
| Fluorómetro: Bio RAD VERSA FLUOR TM FLUOROMETER 360-40 / 460 – 10 | Zetasizer Nano series |
| Lector de placas: MULTISKAN ASCENT LABSYSTEMS | |

5.2 REACTIVOS Y SOLUCIONES

5.2.1 Nanopartículas

Pluronic F-68 , Sigma

Ácido acético 1%

Silica fumed, Sigma, S 5130 – 500 G, batch 065K0154, T.P. 0.007 µm

Ethyl cyanoacrylate (ECA)

5.2.2 Ensayos de Citotoxicidad

5.2.2.1 PBS, Buffer de fosfatos, pH 7.2 – 7.4

Cloruro de Potasio Cristal (KCl), J. T. Baker

Fosfato de Potasio Monobásico Cristal (KH₂PO₄) 99.2%, J. T. BAKER

Cloruro de Sodio 99.5%, PRODUCTOS QUÍMICOS MONTERREY

Fosfato de Sodio dibásico anhidro (Na₂HPO₄) 99 – 100.5%, J. T. BAKER

5.2.2.2 TBARS

2 –Thiobarbituric acid, 98%, SIGMA – ALDRICH

Dimethyl sulfoxide (DMSO), SIGMA – ALDRICH

Malondialdehído (MDA) bis (dimetyl acetal) 99%, ALDRICH

Tritón^R. 1% en PBS

HClO₄ 2.5%

Preparación 10 mL TBA 0.67% : 0.0681 + 1 mL DMSO + aforo a 10 con H₂O desionizada

5.2.2.2.1 PBS con inhibidores de proteasas

Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), >99%, SIGMA

Azida de Sodio, SIGMA – ALDRICH

Sal disódica, dihidrato cristal (EDTA), J. T. BAKER

5.2.2.3 BRADFORD

Albumine bovine serum (molecular biology tested) SIGMA. *Solución stock: 1mg/mL*

Dye reagent Concentrate, BIO – RAD PROTEIN ASSAY. *1:4 (agua desionizada)*

5.2.2.4 GSH

Glutathione reduced, MP BIOMEDICALS. *Solución stock: 50 mM*

Phtaldehyde, SIGMA. *1% etanol absoluto*

5.3 METODOLOGÍA

5.3.1 Preparación de los sistemas nanoparticulados

Se prepararon 300 mL de cada sistema, de acuerdo a la siguiente tabla de componentes:

| Tabla 1 "Composición de los sistemas nanoparticulados" | | | | | |
|--|-----------------------------|-----------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | Control de SiO ₂ | Control de PECA | Sistema 1 SiO ₂ /PECA | Sistema 2.1 PECA /SiO ₂ | Sistema 2.2 PECA /SiO ₂ |
| Ácido acético | 1% | 1% | 1% | 1% | 1% |
| Pluronic F-68 | 1% | 1% | 1% | 1% | 1% |
| SiO ₂ | 0.1% | - | 0.1% | 0.1% | 0.1% |
| PECA | - | 1.75 µL/mL | 1.75 µL/mL | 1.75 µL/mL | 1.75 µL/mL |

Para todos los sistemas se preparó el medio de la siguiente forma:

En un vaso de precipitados se vertieron 300 mL de medio de ácido acético al 1% (pH ~ 2) con ayuda de una probeta graduada. Se hidrató el Pluronic. Una vez que éste no se apreciaba, se coloca el vaso de precipitados debajo de la propela del agitador mecánico *Laboratory Mixer Stir – Pak^R*, a 343 rpm.

5.3.1.1 Control SiO₂

Se agregó el SiO₂ poco a poco. Se mantuvo en agitación constante durante 1 hora a 343 rpm.

5.3.1.2 Control PECA

Se tomaron 535 µL de ECA con una micropipeta. Se vertió poco a poco (gotas pequeñas). La punta se enjuagó 3 veces con el medio en agitación. Se mantuvo en agitación constante durante 1 hora a 343 rpm.

5.3.1.3 Sistema 1 SiO₂/PECA

Se agregó el SiO₂ poco a poco. Se mantuvo en agitación constante durante 30 minutos a 343 rpm. Se tomaron 535 µL de ECA con una micropipeta. Se vertió poco a poco (gotas pequeñas). La punta se enjuagó 3 veces con el medio en agitación. Se mantuvo en agitación constante durante 1 hora a 343 rpm.

5.3.1.4 Sistema 2.1 PECA/SiO₂

Sistema A: En 150 mL del medio se agregó el SiO₂ poco a poco y se agitó a 343 rpm hasta que estuviese disperso.

Sistema B: En 150 mL, con una micropipeta se vertieron 535 µL de ECA poco a poco (gotas pequeñas). La punta se enjuagó 3 veces con el medio en agitación. Se mantuvo en agitación constante durante 30 minutos a 343 rpm.

Transcurridos los 30 minutos, aun en agitación a 343 rpm, se vertió el *sistema A* en el *B*. Se mantuvo en agitación constante durante 1 hora a 343 rpm.

5.3.1.5 Sistema 2.2 PECA/SiO₂

Estando en agitación el *sistema B*, se vertió el sistema A y se mantuvo en agitación constante durante 1 hora a 343 rpm.

5.3.2 Purificación de los Sistemas

Para purificar las nanopartículas, cada sistema se hizo pasar por varios filtros en el siguiente orden.

1. Gravimetría.
2. Al vacío, haciendo uso de papel filtro para electroforesis (que tiene un tamaño de poro más pequeño).
3. A través de una membrana de 0.45 µm
4. A través de una membrana de 0.2 µm, en un equipo de filtración al vacío en condiciones estériles.

Manteniendo el ambiente estéril los sistemas se guardaron en tubos estériles de 50 mL, y se sellaron con papel parafilm^R, para posteriormente almacenarlos en refrigeración (4 °C).

5.3.3 Dilución de los sistemas para la administración de las ratas

De cada sistema de nanopartículas se realizó la siguiente dilución:

$$\text{Dosis Alta} = 12.5 \text{ mL del sistema} + 12.5 \text{ mL SSF} = 1:1$$

$$\text{Dosis baja} = 1.25 \text{ mL del sistema} + 11.25 \text{ Control} + 12.5 \text{ SSF} = 1:10$$

El “Control” que se ocupó para la dilución, es un sistema blanco que solo contiene el medio de dispersión de las nanopartículas: Pluronic y Ácido acético.

5.3.4 Secado de los sistemas nanoparticulados para calcular su concentración.

Para establecer las dosis administradas de nanopartículas, los sistemas se secaron para reportar las dosis a administrar en mg/Kg. Esto se realizó de la siguiente forma.

1. Se llevaron viales a peso constante.
2. Se tomaron 2 mL de cada sistema y se vertió en su respectivo vial.
3. Estos se secaron en una estufa hasta que alcanzaron peso constante.
4. De acuerdo a los pesos obtenidos se calcularon las dosis.

5.3.5 Manejo de modelos animales

Como modelo experimental se utilizaron ratas Wistar macho, jóvenes (entre 120 y 180 g), éstas fueron divididas en 4 grupos de 4 ratas cada uno. Los lotes se denominaron: Blanco, Control, Dosis Alta y Dosis Baja para cada exposición a los sistemas de nanopartículas en estudio. Los animales se mantuvieron la primera semana en observación y aclimatación en el bioterio de la FES-Cuautitlán. Iniciada la segunda semana las ratas

de experimentación fueron expuestas por vía intraperitoneal a las nanopartículas en estudio de manera alternada (un total de 3 veces), es decir, el día 1 se le administraba la primera dosis, el 2° día no recibían exposición a nanopartículas sino hasta el 3er y 5° día.

Cada dosis de nanopartículas administrada debía estar contenida en un volumen de 0.5 mL. Los animales en experimentación tenían acceso a comida y agua *ad libitum*. El lunes de la tercera semana, las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y se extrajeron los siguientes tejidos: sangre (por punción cardiaca), corazón, pulmones, bazo, hígado, riñón, médula ósea y testículo. De cada órgano se congeló una muestra para las pruebas de citotoxicidad y otra muestra se fijó en Formaldehído al 4% para pruebas histopatológicas de proyectos futuros.

5.3.6 Pruebas detalladas de citotoxicidad in vivo

5.3.6.1 Tratamiento de las muestras (órganos)

- Etiquetar microtubos de 1.5 mL. Enfriarlos. Codificación:
 - a) Homogenado de muestras.
 - b) Proteínas por duplicado.
 - c) TBARS por duplicado.
 - d) GSH.
- Verter 1 mL de PBS con inhibidores de proteasas, pH ~ 7.4 y congelar. (Tubo a)
- Sacar las muestras del congelador y sumergir los tubos en hielo.
- Tomar una muestra del órgano congelado con espátula aproximadamente de 0.5 cm³ y depositarlo en un tubo el microtubo previamente preparado. (1)
- Mantener los tubos sumergidos en hielo.
- Homogenar la muestra en el *Mixer Lab – Homogenizer Glas – col Variable Reversible*. Manteniendo el tubo sumergido en hielo con ayuda de un vaso de precipitados de 50 mL.
- Sonicar el tejido en el sonicador con 97% de amplitud 3 pulsos durante 10 segundos, por triplicado. Manteniendo el tubo sumergido en hielo con un ayuda de un vaso de precipitados de 50 mL.
- Enjuagar el pistilo 3 veces con agua desionizada cada vez que se cambie la muestra.
- Centrifugar los tubos a 12 000 rpm, 10 minutos a 4 °C.
- Tomar 2 µL del sobrenadante y apartarlo en otro microtubo con 1 mL de PBS previamente preparado y frío. Congelar. *Muestra para cuantificación de proteínas.*
- Tomar 400 µL del resto de sobrenadante con micropipeta cuidando de no tocar el *pellet*, y verterlo en otro microtubo
- Agregar 400 µL de HClO₄ 2.5% y dejar reaccionar a temperatura ambiente 30 minutos.
- Centrifugar 14 000 rpm, 7 minutos, 4°C. Mantener los tubos en hielo.
- Tomar 110 µL del sobrenadante con micropipeta y verterlo en tubo c. (duplicado de tubos por muestra).
- El resto del sobrenadante colocarlo en tubos d.
- Congelar todos los tubos para las pruebas posteriores.

5.3.6.2 Tratamiento de las muestras (plasma)

- Etiquetar microtubos de 1.5 mL. Enfriarlos.
 - a) Homogenado de muestras.
 - b) Proteínas por duplicado.
 - c) TBARS por duplicado.
 - d) GSH.
- Tomar 2 µL del sobrenadante y apartarlo en otro microtubo con 1 mL de PBS previamente preparado y frío. Congelar. *Muestra para determinación de proteínas.*
- Tomar 400 µL del resto de sobrenadante con micropipeta cuidando de no tocar el *pellet*, y verterlo en otro microtubo.
- Agregar 400 µL de HClO₄ 2.5% y dejar reaccionar a temperatura ambiente 30 minutos.
- Centrifugar 14 000 rpm, 7 minutos, 4°C. Mantener los tubos en hielo.
- Tomar 110 µL del sobrenadante con micropipeta y verterlo en tubo c. (duplicado de tubos por muestra).
- El resto del sobrenadante colocarlo en tubos d.
- Congelar todos los tubos para las pruebas posteriores.

5.3.6.3 Determinación de TBARS (especies reactivas de oxígeno) en microplaca 96 pozos.

- Descongelar las muestras previamente preparadas en el refrigerador.
- Sumergir en hielo.
- Si se observan turbias, centrifugar a 12 000 rpm, 5 minutos, 4°C.
- Agregar a cada tubo 110 µL de Ácido Tiobarbitúrico (preparado en el momento).
- Calentar a 90 °C durante 30 minutos.
- Centrifugar 14 000 rpm, 5 min., 4 °C.
- Tomar 200 µL por pozo.
- Leer en equipo a 540 nm.
- Interpolar en la curva de calibración (ANEXO III, Fig. 46)
- Reportar en nmol MDA/mg de proteína

5.3.6.4 Determinación de GSH (Glutación Reducido) por método fluorométrico en muestras de órganos

- Agregar a microtubos de 2 mL color ámbar previamente etiquetados, 1 mL PBS/EDTA 50 mM pH 8 y 50 µL de agua desionizada (el PBS se filtra previamente a las determinaciones).
- Enfriar.
- Descongelar las muestras reservadas para la cuantificación de GSH, previamente, en el refrigerador.
- Centrifugar las muestras descongeladas a 12 000 rpm, 10 min, 2 °C.
- Sumergir en hielo tanto los tubos ámbar, como las muestras centrifugadas.
- Agregar 50 µL del sobrenadante a los sistemas previamente preparados por duplicado.
- Agitar en el vortex 5 segundos cada sistema
- Completar a 2 mL los sistemas con PBS/EDTA 50 mM pH 8 (0.8 mL)

- Agitar en el vortex 5 segundos cada sistema, invirtiendo el tubo 2 veces para volver a agitar en el vortex.
- En oscuridad total (alumbrando con luz amarilla) agregar 100µL de OPT (1% en etanol), mantener el OPT y las muestras sin reaccionar sumergidas en hielo.
- Agitar en el vortex 5 segundos cada sistema invirtiendo 2 veces cada tubo para volver a agitar en el vortex otros 5 segundos.
- Dejar reaccionar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Vaciar la muestra en la celda, regresarlo al tubo y volver a decantarlo en la celda.
- Leer la muestra en el fluorómetro utilizando los filtros de emisión y excitación.
- Interpolar en la curva de calibración (ANEXO III, Fig. 45)
- Reportar en nmol GSH / mg de proteína.

5.3.6.5 Cuantificación de GSH (Glutación Reducido) por método fluorométrico en muestras de plasma

- Agregar a microtubos de 2 mL color ámbar previamente etiquetados, 1 mL PBS/EDTA 50 mM pH 8 y 50 µL de agua desionizada.
- Enfriar.
- Descongelar las muestras para GSH, previamente separadas, en el refrigerador.
- Centrifugar las muestras descongeladas a 12 000 rpm, 10 min, 2 °C.
- Sumergir en hielo tanto los tubos ámbar, como las muestras centrifugadas.
- Agregar 100 µL del sobrenadante a los sistemas previamente preparados por duplicado.
- Agitar en el vortex 5 segundos cada sistema
- Completar a 1.5mL los sistemas con PBS/EDTA 50 mM pH 8 (0.4mL)
- Agitar en el vortex 5 segundos cada sistema.
- En oscuridad total (alumbrando con luz amarilla) agregar 75µL de OPT (1% en etanol)
- Agitar en el vortex 5 segundos cada sistema.
- Dejar reaccionar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Vaciar la muestra en la celda, regresarlo al tubo y volver a decantarlo en la celda.
- Leer la muestra en el fluorómetro utilizando los filtros de emisión y de excitación.
- Interpolar en la Curva de calibración (ANEXO III, Fig. 45)
- Reportar en nmol GSH / mg proteína

5.3.6.6 Determinación de proteínas, método de Bradford en microplaca (96 pozos)

- Descongelar las muestras previamente preparadas, en el refrigerador. Mantener las muestras sumergidas en hielo.
- Agregar 40 µL de la muestra por pozo.
- Una vez que estén todas las muestras en la placa, agregar 160 µL de reactivo de Bradford 1:4 por pozo.
- Dejar reaccionar 15 min. en agitación (150 rpm), protegiendo de la luz.
- Leer en equipo a 595 nm
- Interpolar en la curva de calibración (ANEXO III,

-).

6 RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se realizaron 5 sistemas nanoparticulados fabricados a base de SiO₂, PECA y la mezcla entre ellos haciendo variaciones en los órdenes y tiempos de adición de los materiales durante su preparación. Esto permitió obtener sistemas nanoestructurados con características diferentes.

| Tabla 2 "Variaciones entre los sistemas híbridos fabricados" | |
|--|--|
| Sistemas Híbridos | Variación |
| Entre el sistema SiO ₂ /PECA y el PECA/SiO ₂ | El orden de adición. El primer material es el que primero se dispersó en el medio, para después de 30 minutos agregar el segundo material. |
| PECA/SiO ₂ 2.1 - PECA/SiO ₂ 2.2 | El tiempo de adición del SiO ₂ . |

Tras la caracterización de los sistemas nanoparticulados únicos fabricados a base de SiO₂ y PECA, consideramos que las nanopartículas obtenidas reflejan propiedades de los materiales en uso *per se* para formar nanoestructuras en las condiciones experimentales de este trabajo (velocidad y tiempo previamente definidos).

De acuerdo a la Tabla 3 y el Gráfico de la Fig. 22 podemos decir que las 2 variables: orden y tiempo de adición, otorgaron características a las nanopartículas híbridas diferentes a los sistemas de composición única.

6.1 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

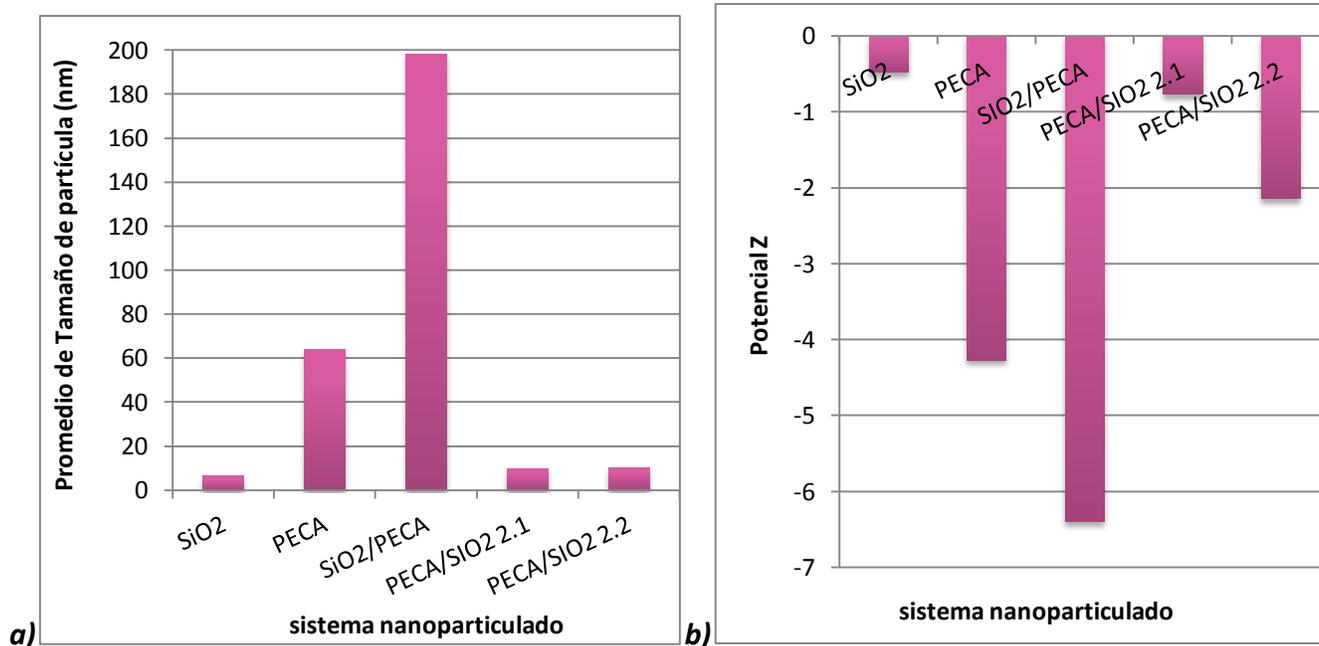
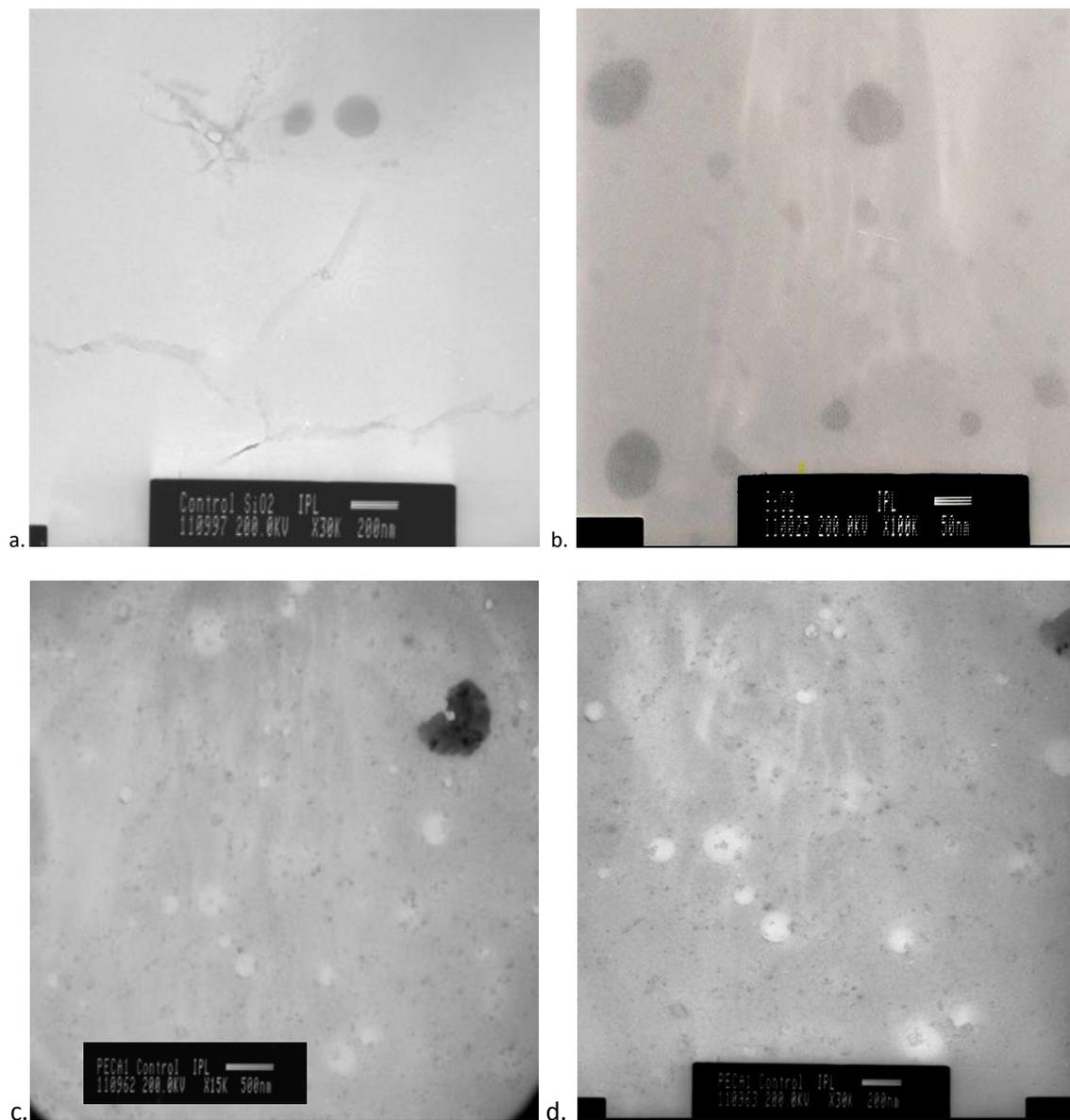


Fig. 22 "Caracterización de los sistemas nanoparticulados a) Tamaño de partícula (nm), b) Potencial Z (mV)

Tabla 3 "Resumen de los resultados de la nanocaracterización"

| Nanopartículas | Control SiO ₂ | Control PECA | Sistema 1 SiO ₂ /PECA | Sistema 2.1 PECA/SiO ₂ | Sistema 2.2 PECA/SiO ₂ |
|--------------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Potencial z (mV) | -0.48 | -4.27 | -6.39 | -0.766 | -2.14 |
| Tamaño de partícula (nm) | 84% - 5.873 16% - 487.4 | 86.8% - 129.6 13.25% - 5.457 | 93% - 284.2 7% - 5.277 | 72.6% - 5.746 23.1% - 212.8 | 60.8% - 5.526 37.6% - 259.9 |
| Promedio | 6.482 | 63.95 | 198.2 | 9.519 | 10.36 |



Nanotoxicología

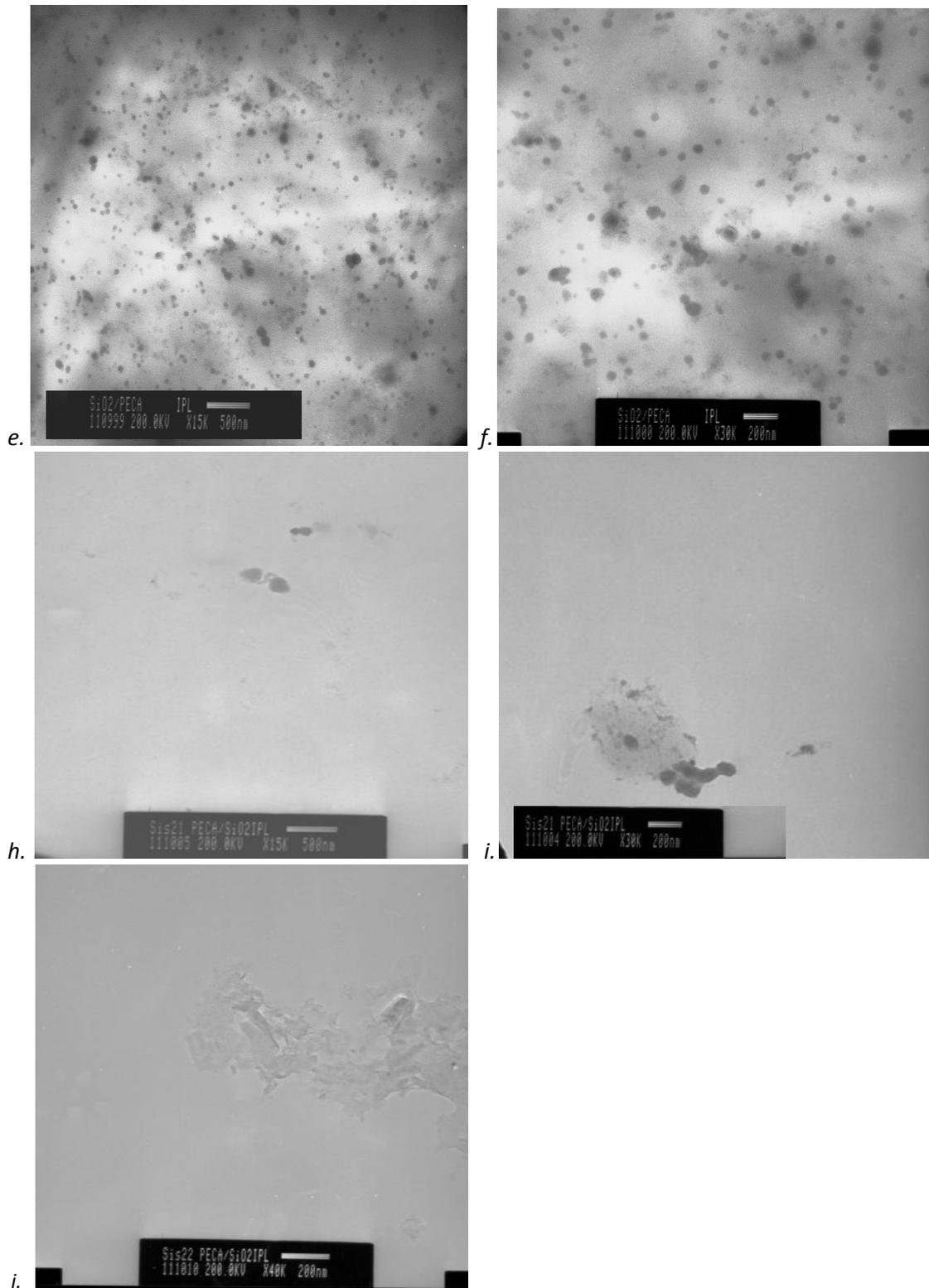


Fig. 23 "Resultados de las micrografías de TEM para los diferentes sistemas nanoparticulados SiO₂(a y b), PECA (c y d), SiO₂/PECA (e y f), 2.1 PECA/SiO₂ (g y h) 2.2 PECA/SiO₂ (j).

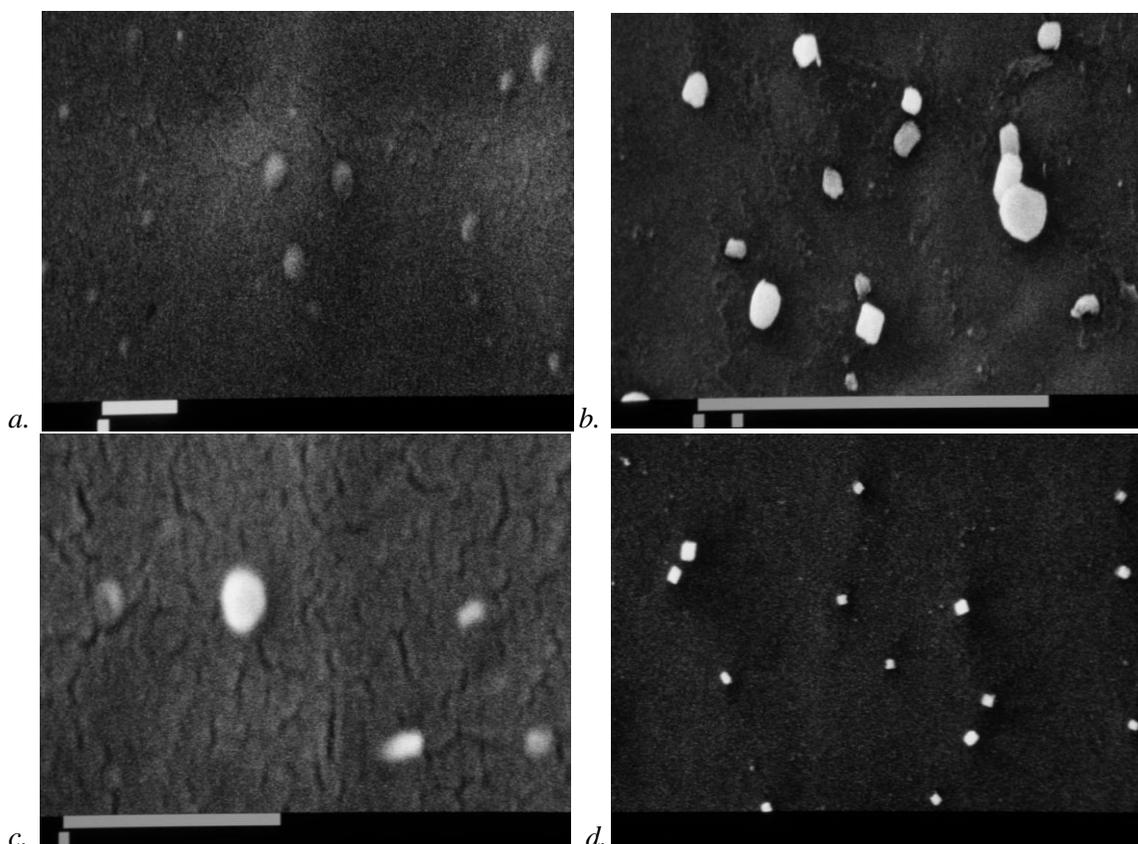


Fig. 24 "Resultados de las micrografías de SEM para los diferentes sistemas nanoparticulados: PECA (a), SiO₂ (b), SiO₂/PECA (c) y PECA/SiO₂ (d)

El "sistema nanoparticulado de SiO₂" tiene un tamaño de partícula promedio de 6.482. De acuerdo a la etiqueta de la materia prima de SiO₂ empleado, su tamaño de partícula es de 7 nm. En el caso de este sistema nanoparticulado se realizó una dispersión pues el material *per se* ya tenía un tamaño de partícula nanométrico.

El potencial Z de todos los sistemas se encuentra dentro del rango de inestabilidad referido para suspensiones (Gasca Zacarías, 2011); posiblemente tendiendo a la aglomeración y/o a la rápida sedimentación que podrían corroborarse en los picos fuera de lugar que se aprecian en los diagramas correspondientes (ANEXO II, Fig. 40 a la 53). Los resultados obtenidos, muestran tamaños de partícula no uniformes o mayores a los 200 nm; éstos teóricamente no deberían existir en el medio, ya que en la purificación, se hicieron pasar por un filtro membrana de 0.22 µm, aunque se puede dar el caso de que al ser partículas cargadas negativamente, y por el movimiento Browniano entre ellas, que éstas se re-suspendan fácilmente o que sean flexibles y puedan pasar a través del filtro.

Claramente se aprecian las diferencias en tamaño y potencial Z entre los sistemas combinados; el primero, SiO₂/PECA resulta tener el tamaño de partícula más grande y el potencial z más bajo. Haciendo una comparación por diferencia entre los valores, éste sistema es un poco más parecido al control de PECA; consideramos que esto puede deberse a que al estar en suspensión el SiO₂, el PECA vaya polimerizándose alrededor de las partículas de SiO₂ y que queden en el interior de la nanopartícula y el PECA en la superficie.

Esto se pudo corroborar con las micrografías de TEM (d, e. Fig. 23). Lamentablemente estas imágenes no tienen una calidad óptima para definir el arreglo estructural de los sistemas híbridos y tampoco las diferencias

entre ellos, pero podemos corroborar que hubo formación de nanopartículas con tamaños no mayores a los 100 nm (aproximadamente), y que los picos poco uniformes observados en los gráficos del ANEXO II para tamaño de partícula (incisos b. de la Fig. 40 a la Fig. 44), se pueden deber a la aglomeración o a la manipulación misma de éstas. Las micrografías solo permiten observar la distribución del tamaño (menor a 200 nm) y que, la mayoría tiende a la aglomeración.

Durante la fabricación de los sistemas se realizó la combinación de los materiales con el propósito de modificar la composición atribuida al diferente arreglo estructural de las moléculas en la formación de la nanopartícula.

En el caso del sistema de SiO₂/PECA primero se dispersó el SiO₂ en el medio y tras 30 minutos de agitación continua se añadió el ECA gota a gota. Al entrar en contacto con los –OH del medio, comienza la polimerización, y se asume que la formación de las nanopartículas será encapsulando el SiO₂ disperso en el medio. También se puede dar el caso de que el SiO₂ se vaya uniendo o entrelazando con los monómeros de ECA. Una forma de confirmar que las nanopartículas se formaron de ambos componentes, es que los sistemas híbridos tengan un mayor tamaño de partícula con respecto al sistema simple de SiO₂ (Fig. 22; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Para el sistema de PECA/SiO₂, primero se agregó el ECA al medio gota a gota y después se dispersó el SiO₂. En el caso de esta combinación se decidió variar el tiempo de adición, generándose así 2 sistemas.

El sistema 2.1 se mantuvo en agitación por 30 minutos para posteriormente dispersar el SiO₂, con esto se pretendió que durante los primeros 30 minutos se llevara a cabo la formación de las nanopartículas de PECA y al añadir el SiO₂ quedase en la superficie como un tipo de recubrimiento.

En el sistema 2.2, el ECA se agregó gota a gota e inmediatamente después se dispersó el SiO₂, a diferencia del sistema anterior, la polimerización se llevó a cabo con las partículas de SiO₂. Con esto se establece que posiblemente al interactuar los dos materiales durante la reacción, el SiO₂ quedara entre los monómeros de PECA.

Los 3 sistemas híbridos o duales, tuvieron tamaños de partícula y potenciales Z distintos, por lo que podemos establecer que el orden de adición y el tiempo influyen en el arreglo de los componentes para darle estructura a la nanopartícula.

Teóricamente, una vez que el ECA empieza a polimerizar, lo cual es inmediatamente al estar en contacto con las moléculas de –OH presentes en el medio, se forman las cadenas del polímero, llega un punto en que éstas cadenas se empiezan a cortar para después irse entramando entre los mismos monómeros o carbonos del polímero ya formado, por diferentes fuerzas (covalentes, Van der Waals, etc.) (Zhao & Nalwa, 2007) Formándose así las nanopartículas de PECA. En el caso de los sistemas 2.1 y 2.2, puede ser que el SiO₂ se vaya uniendo a las cadenas del polímero, evitando así el aumento en el tamaño de la Nanopartícula o que interactúe en alguna de los procesos de polimerización; se puede inferir un comportamiento parecido al SO₂; el cual se ha agregado a partículas de PACA para disminuir su tamaño (Fattal, Peracchia, & COUV, 1997). De este modo, puede ser que el SiO₂ quede entramado en las cadenas de PECA o que las nanopartículas queden **recubiertas**; pues el SiO₂ se ha utilizado en diferentes recubrimientos para mejorar las propiedades de flujo y conductividad de ciertas nanopartículas (Minjung, y otros, 2009; Flores Vivían, 2009).

Es importante considerar estos aspectos metodológicos al momento de optimizar el método de preparación para cada tipo de nanopartículas ya que se ha reportado que las diferentes características de cada sistema nanoestructurado pueden modificar la respuesta biológica y las propiedades toxicológicas asociadas. Debido a que entre el sistema 2.1 y 2.2 de PECA/SiO₂ no se observaron diferencias muy contrastantes, se decidió utilizar solo el sistema 2.1 para la evaluación citotóxica.

Tabla 4 "Resultados del cálculo de la concentración de los sistemas".

| SISTEMA \ DOSIS | ALTA | BAJA |
|---------------------------|--------|--------|
| | mg/mL | |
| PECA | 2.4250 | 0.2425 |
| SiO ₂ | 2.8083 | 0.2808 |
| SiO ₂ /PECA | 2.8667 | 0.2867 |
| PECA/SiO ₂ 2.1 | 4.5250 | 0.4525 |
| PECA/SiO ₂ 2.2 | 3.4000 | 0.3400 |

Tabla 5 "Concentración de nanoparticuladas administrada en 0.5 mL".

| SISTEMA \ DOSIS | ALTA | BAJA |
|---------------------------|---------|---------|
| | mg/mL | |
| PECA | 1.21250 | 0.12125 |
| SiO ₂ | 1.40417 | 0.14042 |
| SiO ₂ /PECA | 1.43333 | 0.14333 |
| PECA/SiO ₂ 2.1 | 2.26250 | 0.22625 |
| PECA/SiO ₂ 2.2 | 1.70000 | 0.17000 |

Con el fin de conocer los efectos tóxicos *in vivo* asociados al estrés oxidativo en diversos órganos, se administraron Nanopartículas de forma subagudas a ratas Wistar macho. Se administraron 0.5 mL en dos dosis, las cuales llamamos Dosis baja y Dosis alta (Tabla 5) de cada sistema nanoparticulado, 4 en total: PECA, SiO₂, SiO₂/PECA y PECA/SiO₂, por cada lote se maneja un grupo "control" para el cual el tratamiento consistió solo en el medio de dispersión de los sistemas nanoparticulados (placebo que contenía sólo Pluronic[®]) la administración se llevó a cabo por vía intraperitoneal de manera alternada durante 9 días, asimismo, se llevo un control en peso de las ratas (Fig. 25).

Las estimaciones de la lipoperoxidación y de la concentración de glutatión reducido se realizaron por método espectrofotométrico y fluorométrico respectivamente, en el hígado, riñón y plasma de las ratas expuestas. Como medida del estado constitucional de las ratas experimentales se registró el peso de las ratas durante el período de experimentación mismo que se muestra en seguida.

La Fig. 25 nos permite observar que existieron diferencias significativas entre algunos de los lotes de ratas controles y las expuestas a las nanopartículas en estudio; es decir, los animales presentan una susceptibilidad a la exposición a ciertas nanopartículas en relación al peso. Podemos observar que algunos animales expuestos presentaron variaciones "significativas" entre sí en relación al peso durante la exposición. El primer lote de animales que fue expuesto a nanopartículas de PECA (Fig. 25, a), aquí se aprecia que la Dosis baja tiene un peso promedio más bajo que los otros 2. En los tratamientos de SiO₂ y SiO₂/PECA (Fig. 25 a y b, respectivamente) se aprecia el mismo comportamiento pero para la Dosis Alta. Al parecer en el tratamiento con PECA/SiO₂ (Fig. 25, d.) no presenta diferencias significativas con respecto al control. Estas variaciones en primera instancia solo pueden atribuirse a las características propias de los individuos integrantes del lote cuya idiosincrasia y capacidad de adaptación les permite responder de manera diferente a las nanopartículas en estudio.

6.2 SEGUIMIENTO DEL PESO DE LAS RATAS

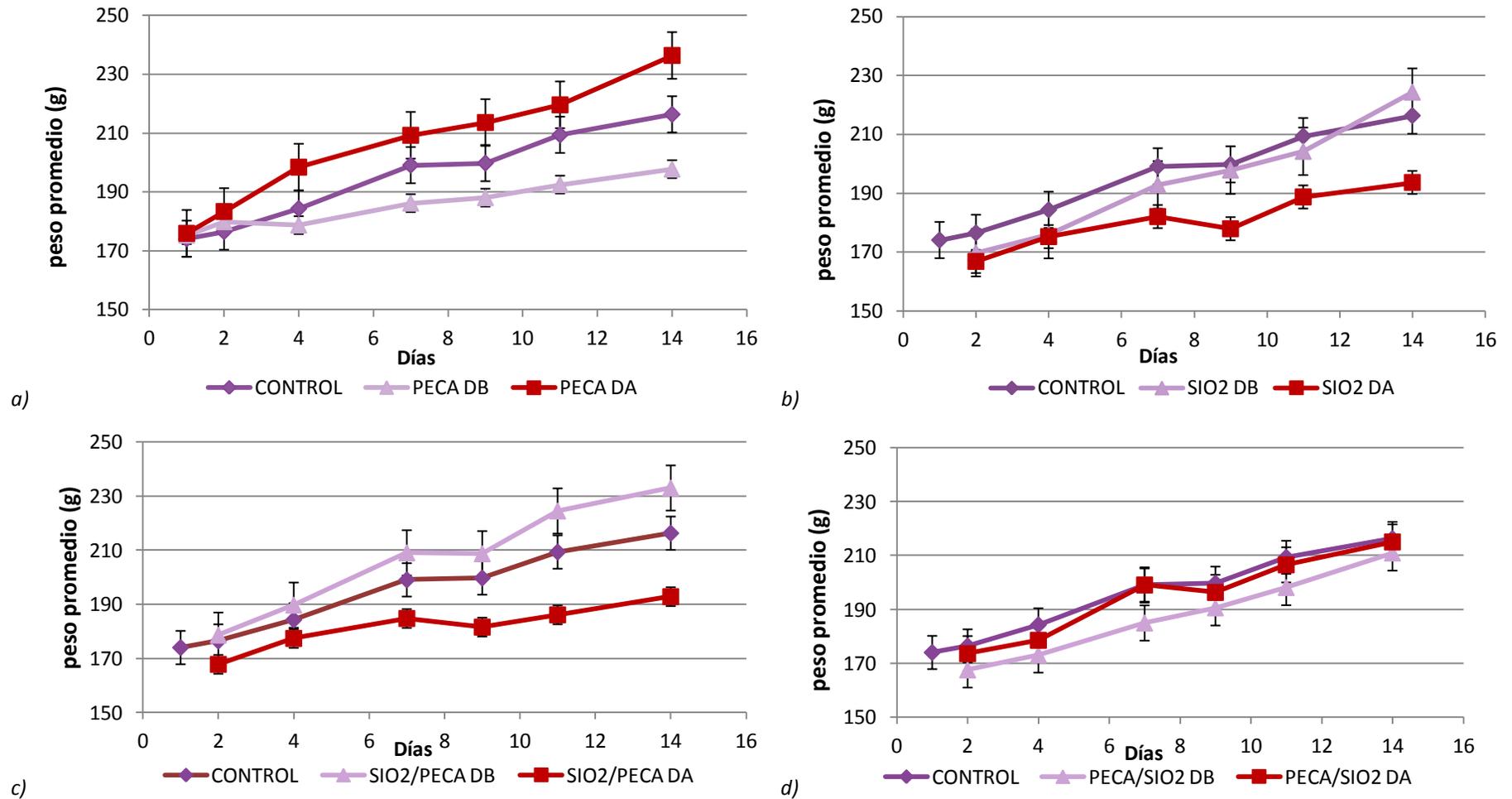


Fig. 25 "Seguimiento del peso de las ratas en los diferentes tratamientos a) PECA b) SiO₂ c) SiO₂/PECA y d) PECA/SiO₂"; a partir del día 8 se administraron los tratamientos"

6.3 EVALUACIONES CITOTÓXICAS

Se realizaron los ensayos de TBARS y GSH como evaluaciones de citotoxicidad asociada al estrés oxidativo, ya que este representa uno de los principales mecanismos de acción de diversos xenobióticos. A pesar de que se extrajeron varios órganos, se decidió trabajar con plasma, hígado y riñón por la relevancia de su función en los organismos. En el caso del hígado y riñón, hay evidencias en la literatura, que para algunas Nanopartículas son *órganos blanco* de acuerdo a la toxicocinética y toxicodinamia de estos xenobióticos (Minjung, y otros, 2009; Vauthier, Dubernet, Chauvierre, Brigger, & Couvreur, 2003; Vinod & Diandra L. , 2007; Xie, Sun, Zhong, Shi, & Zhang, 2010; Zhao & Nalwa, 2007).

De acuerdo a los principios toxicocinéticos sabemos que la distribución de un principio activo, o xenobiótico normalmente se hace por vía sanguínea, si la administración fue diferente a la aérea; el metabolismo y la capacidad de biotransformación principalmente en el hígado, y como principal órgano de eliminación, el riñón. Sin embargo, las características propias de cada xenobiótico son factores que influyen ampliamente el evento de exposición tóxica.

Existen evidencias que le atribuyen a las nanopartículas la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ERO) o a alterar el metabolismo normal de la célula de modo tal, que se incremente la concentración de radicales libres por un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes ; y que finalmente se manifieste como **estrés oxidativo** en la célula (Zhao & Nalwa, 2007), tras una serie de reacciones instantáneas con macromoléculas, principalmente con los dobles enlaces de los lípidos, grupos amino de las proteínas y el DNA. Esta serie de eventos se le atribuirán al potencial citotóxico inherente de cada sistema nanoparticulado.

Por la complejidad en los sistemas celulares, no existe un mecanismo de *acción cronológico*, es decir, se desconoce que ocurre primero: si las nanopartículas generan directamente los radicales libres, si estos radicales en primera instancia reaccionan con los lípidos de membrana generando MDA, si los mecanismos antioxidantes (GSH) empiezan a activarse una vez que las concentraciones de MDA rebasan el equilibrio, o si el MDA se forma una vez que la concentración de GSH disminuye su función antioxidante.

El sistema GSH/GSSG es uno de los principales mecanismos antioxidantes con el que cuentan los seres vivos (reducción/oxidación), así como detoxificante (por reacciones de conjugación).

Los antioxidantes mantienen el equilibrio dentro de la célula cuando ésta experimenta diferentes grados de estrés oxidativo (Fig. 26), estos sistemas se regulan por retroalimentación negativa. Cuando hay un exceso de agentes oxidantes o ERO, se promueve la producción de éstos en la célula, si la concentración de oxidantes sobrepasa la de antioxidantes, podemos hablar de estrés oxidativo y presencia de daño oxidativo celular; éste puede manifestarse de diferentes maneras de acuerdo a los mecanismos moduladores que ponen en marcha la célula. Experimentalmente podemos cuantificar una mayor producción de MDA tras la oxidación de los radicales libres con los PUFA de la membrana celular (Fig. 27).



Fig. 26 "Posible correlación entre los 2 analitos evaluados como parámetros de citotoxicidad"

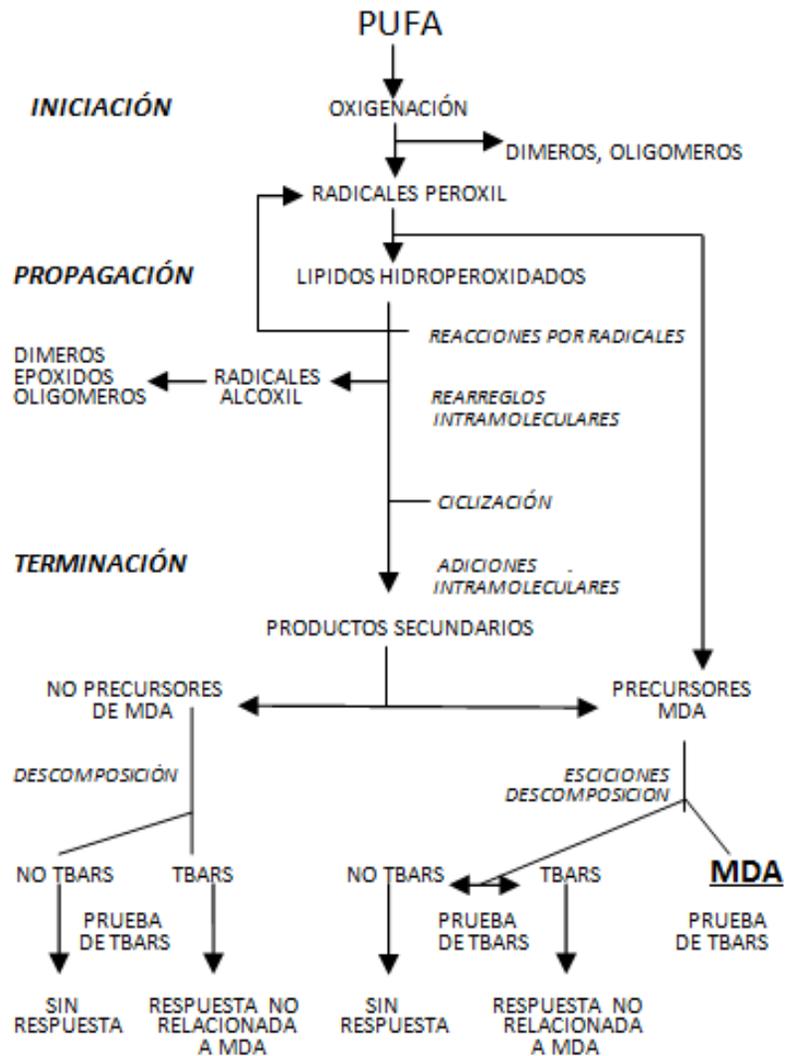


Fig. 27 "Representación de la formación de MDA a partir de los PUFA auto oxidados y los factores que influyen en la formación de MDA derivada de lípidos y el aducto 1:2 MDA:TBA (no se representa ni la formación metabólica (Fig. 28) ni el producto MDA/TBARS no lipídico" (Janero, 1990)

Como se ilustra en la Fig. 28, el MDA surge como producto secundario de la formación de eicosanoides y de la lipoperoxidación (Fig. 16 de la página 37).

Nanotoxicología

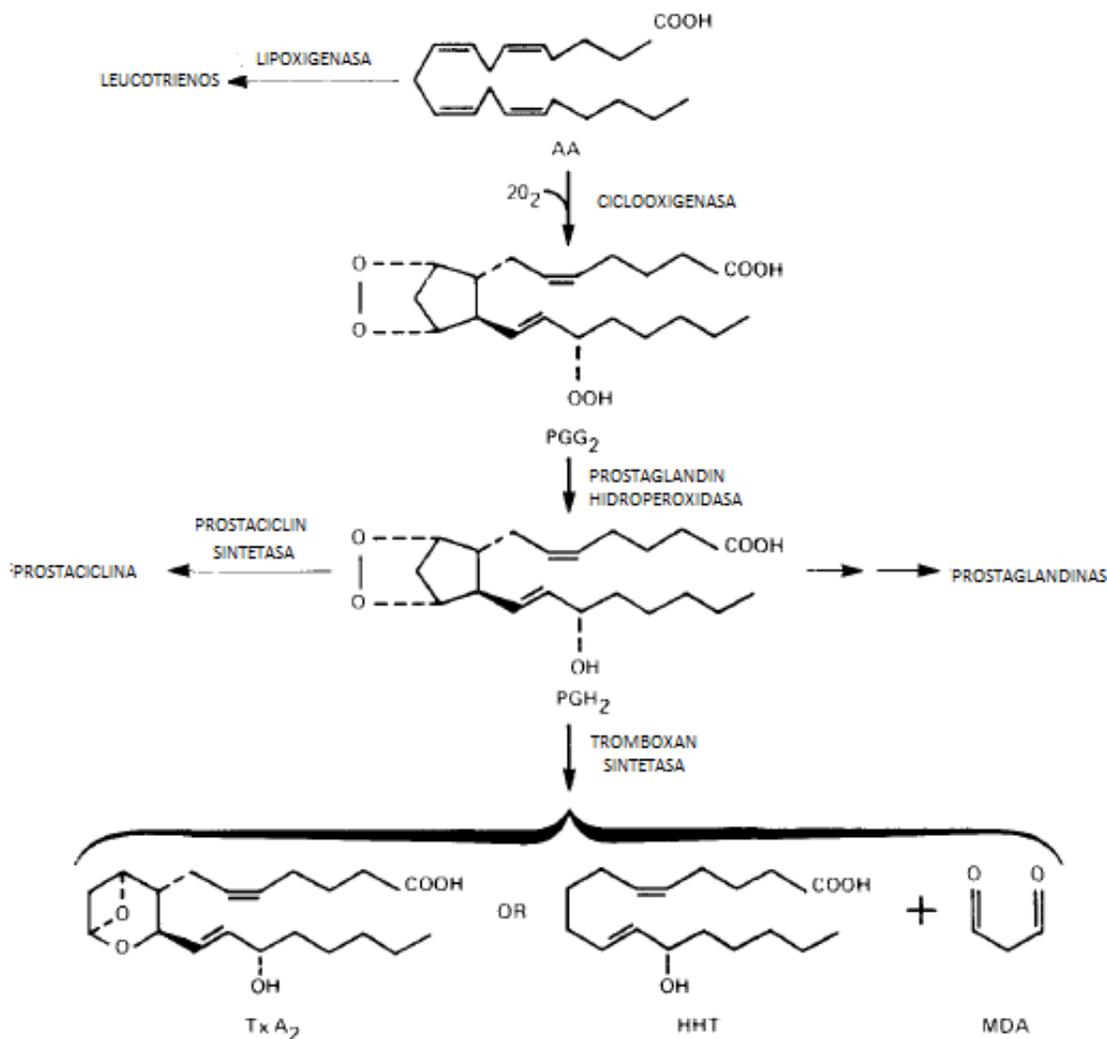


Fig. 28 "Formación metabólica de MDA del ácido araquidónico (AA) durante la biosíntesis de eicosanoides. El MDA surge como un producto secundario de la conversión enzimática de la prostaglandina H₂ (PGH₂) en dos especies lipídicas, Tromboxano A₂ (TxA₂) y ácido 12 (L)-hidroxi-5, 8,10-heptadecatrienoico (HHT). (Janero, 1990).

Los gráficos de la Fig. 29 y Fig. 30 representan los resultados generales, se reportan por analito (GSH y TBARS, respectivamente), agrupados por cada tratamiento cuantificado en los 3 órganos: plasma, hígado y riñón, en el caso de TBARS sólo se reportaron los datos en hígado y riñón. En primera instancia, estos resultados abren un panorama general del comportamiento de las nanopartículas en los diferentes tejidos, corroborando que los tratamientos evaluados en sus diferentes dosis causan efectos en magnitud y grado diferente sobre la cantidad de TBARS y GSH *in vivo*; la exposición *in vivo* a las nanopartículas en estudio indujeron diferencias significativas en la concentración de GSH y TBARS con respecto al blanco.

Nanotoxicología

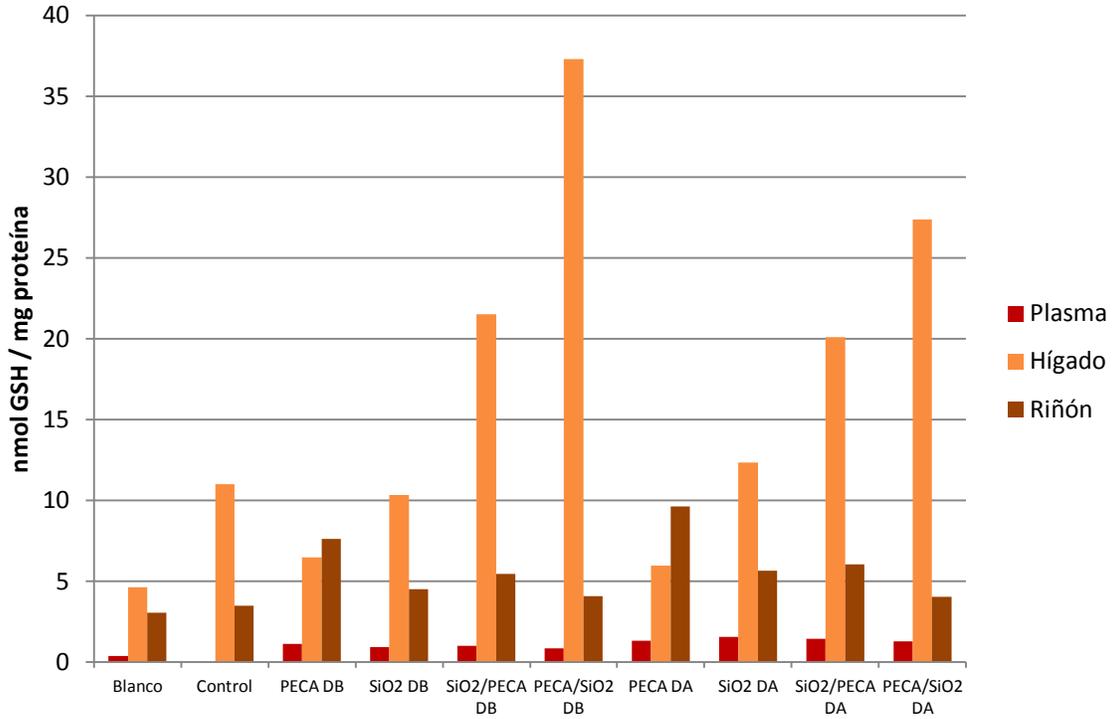


Fig. 29 "Concentración de Glutati6n (GSH) obtenido en Plasma, Hígado y Riñ6n por cada sistema nanoparticulado"

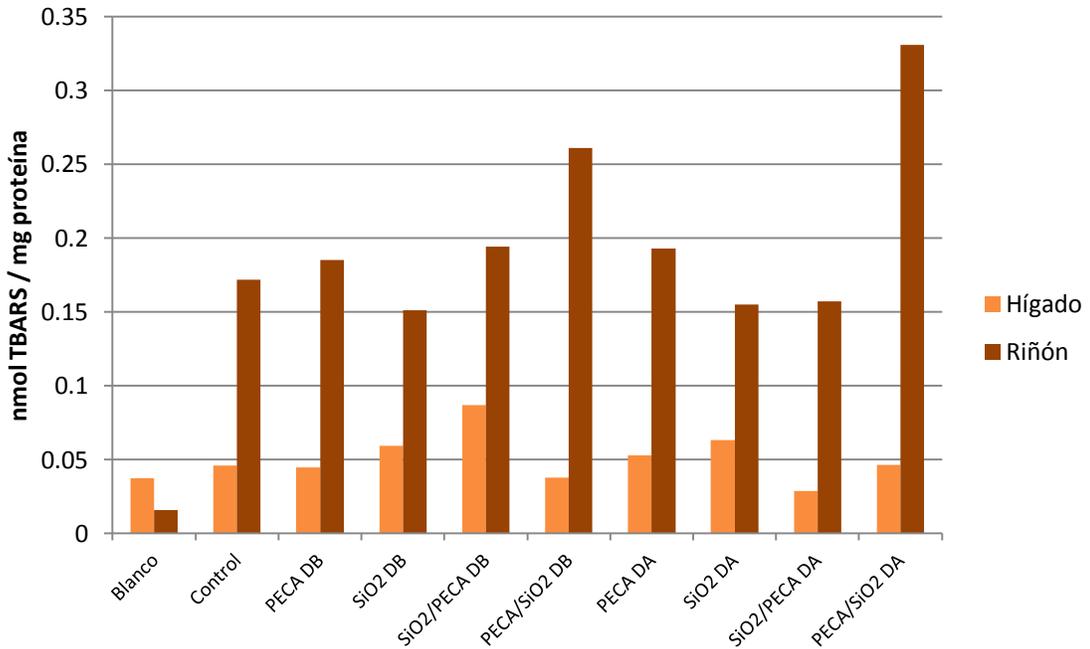


Fig. 30 "Concentraci6n de TBARS en Hígado y Riñ6n por cada tratamiento administrado en sus 2 dosis (baja y alta)"

En la Fig. 29, el blanco muestra que el órgano con más concentración “basal” de GSH es el hígado, seguido del riñón y por último el plasma (Anexo I, Tabla 12). Tras la administración de los tratamientos, se aprecia claramente la elevación de este antioxidante, siendo el hígado el más sensible.

Por el contrario, en el gráfico de la Fig. 30 el órgano que muestra una elevación más marcada en la concentración de MDA con respecto al grupo blanco es el riñón. De acuerdo a Limón Pacheco & Gonsebatt, 2009 et. al, los órganos y tejidos de organismos complejos (como mamíferos) contienen diferentes sistemas antioxidantes, y en esto se basa la susceptibilidad a los agentes tóxicos, en este caso, asociados al estrés oxidativo atribuido a la exposición a las nanopartículas.

El MDA no pudo ser cuantificado en plasma, las absorbancias resultaron muy bajas, y en muchos casos negativos. (Lapenna, Ciofani, Pierdomenico, Giamberardino, & Cuccurullo, 2001), et. al menciona que en el plasma hay muchos constituyentes que pueden interferir con la prueba, el MDA reacciona con las proteínas y otros fluidos del plasma y puede ser metabolizado en muestras biológicas (Siems & Grune, 2005). Además las condiciones de reacción afectan la relación entre el TA (*Tiobarbituric acid*: ácido tiobarbitúrico) y el plasma, los resultados no reflejan la concentración real de TBARS y sólo una pequeña parte es debida al MDA. Se ha sugerido desarrollar técnicas analíticas más sensibles que permitan estimar la cantidad de MDA formado por efecto del xenobiótico.

Como es sabido, el Hígado es el órgano encargado de la biotransformación de la mayoría de los xenobióticos, idealmente éstos son eliminados por el sistema inmune y mediante reacciones de fase I y fase II, cuenta con sistemas reguladores en mayor proporción que el riñón, de acuerdo a la Tabla 12, del Anexo 1, la proporción de GSH en hígado con respecto al riñón es casi 2:1, por esto es posible que, al entrar en contacto el Hígado con los sistemas nanoparticulados, estos mecanismos se activen e impidan el daño oxidativo en las células hepáticas. Si los niveles de GSH se comprometen, el organismo en respuesta sintetiza de nuevo con el fin de restablecer cuanto antes la homeostasis celular y disminuir el riesgo (Limón Pacheco & Gonsebatt, 2009); por el contrario el riñón, al no contar con la misma capacidad de respuesta, resulta ser más sensible a la exposición a los tratamientos y se ve reflejado en los niveles altos de MDA que se aprecian el gráfico de la Fig. 30.

Por otro lado, las evidencias señalan la inestabilidad del MDA en presencia de concentraciones milimolares de H₂O₂ lo que sugiere el MDA es descompuesto directamente por oxidantes fuertes, bajo condiciones ácidas (pH ~ 5). El MDA forma radicales que reaccionan con el O₂ para formar un peróxido. El MDA derivado de este peróxido junto con la interacción de la enzima peroxidasa, establece un ciclo propagatorio de degradación oxidativa de MDA. (Janero, 1990). Esto sugiere que, así como las Nanopartículas propician la formación de ROS y que éstos reaccionan con los complejos celulares provocando la oxidación de proteínas, lípidos y DNA para llevar a la formación del MDA como producto secundario, éste efecto modula señales celulares que promueven la reacción con los radicales libres en exceso, propiciando el catabolismo del MDA. De esta manera, el MDA se degrada y en contraparte, la concentración de ROS aumenta, propiciando una mayor producción de GSH para mantener el equilibrio en hígado.

También existen evidencias que pudieran asociarse con la presencia de una mayor concentración de MDA en el riñón, ya que los metabolitos del MDA, como el *N*-acetil- ϵ -(2-propenal) lisina, son excretados por orina y estos pueden tener potencial tóxico. (Janero, 1990).

Aunado a esto hay evidencias que muestran que la biodistribución de las nanopartículas puede ser específica para ciertos tejidos, lo que sugiere la incorporación de la partícula al tejido y eventualmente acumulación con los riesgos inherentes a éste (Fernandez Urrusono, Fattal, Porquet, Feger, & Couvreur, 1995; Minjung, y otros, 2009; Vauthier, Dubernet, Chauvierre, Brigger, & Couvreur, 2003; Vinod & Diandra L. , 2007; Xie, Sun, Zhong, Shi, & Zhang, 2010; Zhao & Nalwa, 2007).

Los siguientes gráficos representan los resultados obtenidos en cada órgano, de esta forma se puede apreciar que la dosis administrada afecta de manera distinta, aunque se aprecia una tendencia parecida entre los sistemas, ésta no es igual en magnitud pero en comportamiento sí; lo que nos lleva a sugerir que existe como producto a la exposición a las nanopartículas.

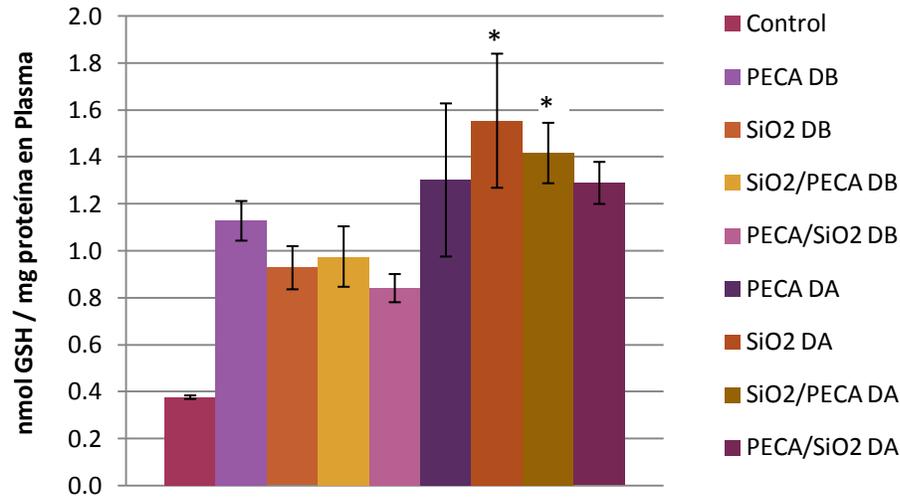


Fig. 31 "Concentración de Glutatión reducido (GSH) en Plasma por cada tratamiento a dosis baja (DB) y alta (DA)"

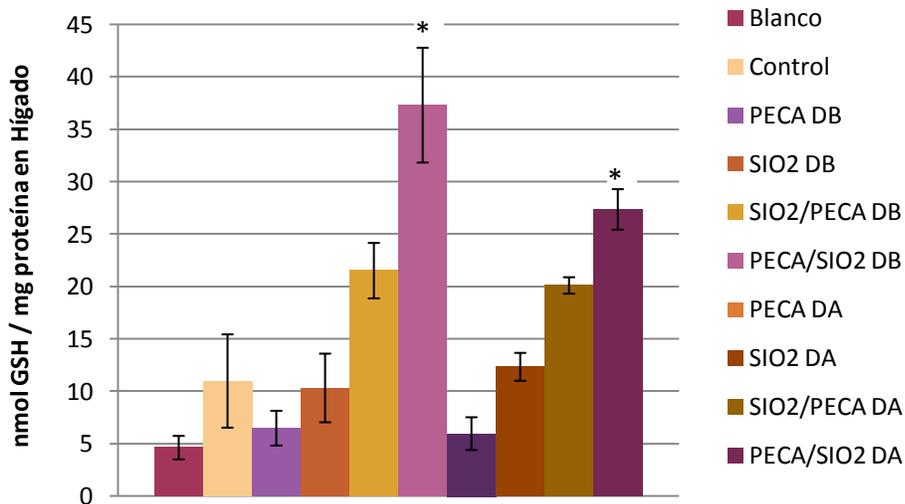


Fig. 32 "Concentración de Glutatión reducido (GSH) en Hígado por cada tratamiento a dosis baja (DB) y alta (DA)"

Por lo que se aprecia en este gráfico (Fig. 32), todos los sistemas nanoparticulados ejercen un efecto en las concentraciones de Glutatión sobre el Blanco. Las dosis altas de los diferentes tratamientos administrados en

general, provocan un mayor incremento sobre los niveles de Glutati3n reducido en plasma en comparaci3n con las dosis bajas.

El gr3fico de la Fig. 33 deja claro que la composici3n de la nanopart3cula causa un efecto individual en el h3gado, siendo mayor en los sistemas h3bridos (SiO₂/PECA y PECA/SiO₂) que en los simples; a su vez, cada combinaci3n se comporta diferente, a pesar de estar elaborado de los mismos materiales en las mismas concentraciones. Se podr3a decir que el orden de adici3n durante la fabricaci3n de los sistemas nanoparticulados, le va a conferir una composici3n estructural con diferentes propiedades, las cuales se ven reflejadas en el efecto citot3xico apreciado en los niveles de GSH.

En este 3rgano no se aprecia un efecto por parte de la dosis administrada.

En el gr3fico de la Fig. 33 tambi3n se aprecia un incremento en los niveles de GSH con respecto al blanco y al control. Al parecer este efecto es atribuido a la composici3n de la nanopart3cula y no a la dosis en s3.

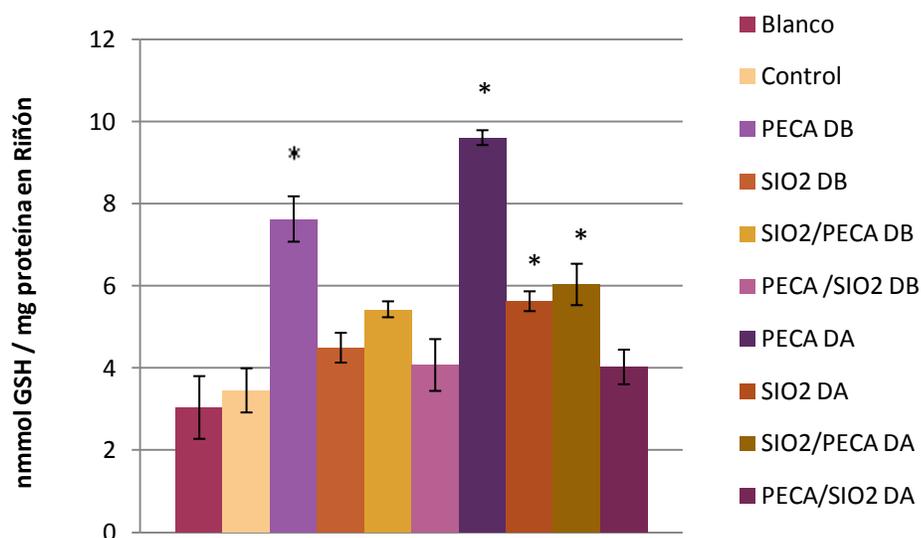


Fig. 33 "Concentraci3n de Glutati3n reducido (GSH) en Ri3n3n por cada tratamiento a dosis baja (DB) y alta (DA)"

Estos resultados destacan el efecto producido por las nanopart3culas de PECA, y que al parecer, al estar en combinaci3n con el SiO₂, le confiere propiedades fisicoqu3micas que aminoran su potencial citot3xico en Ri3n3n, ya que mientras que en h3gado este sistema no provoca la elevaci3n de los niveles de GSH, en ri3n3n casi los triplica.

Nanotoxicología

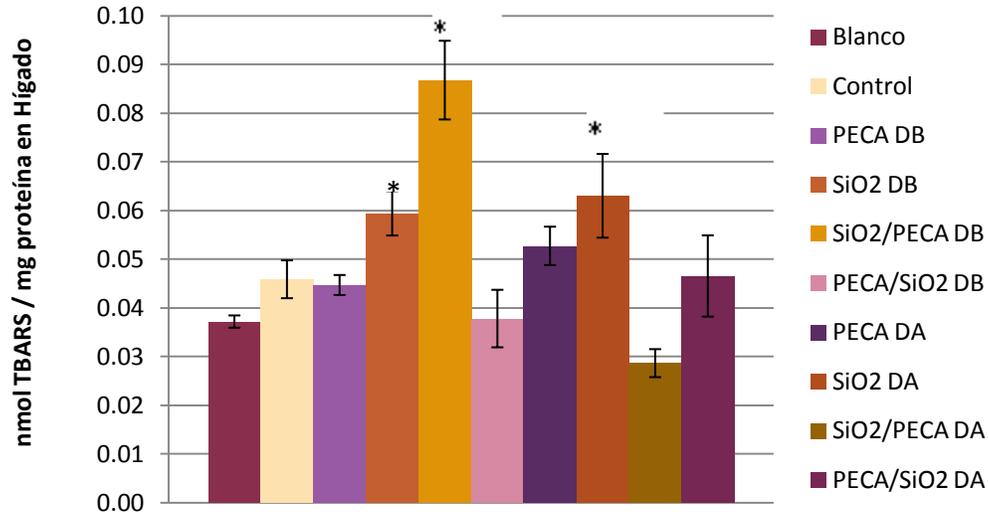


Fig. 34 "Concentración de TBARS en Hígado por cada tratamiento a dosis baja (DB) y alta (DA)"

En este gráfico no se aprecian diferencias entre las dos dosis administradas de cada tratamiento, sin embargo también refleja un comportamiento individual determinado por su composición. Al parecer el sistema simple de SiO₂ y el híbrido de SiO₂/PECA son los que provocan mayor efecto en la concentración de MDA en hígado.

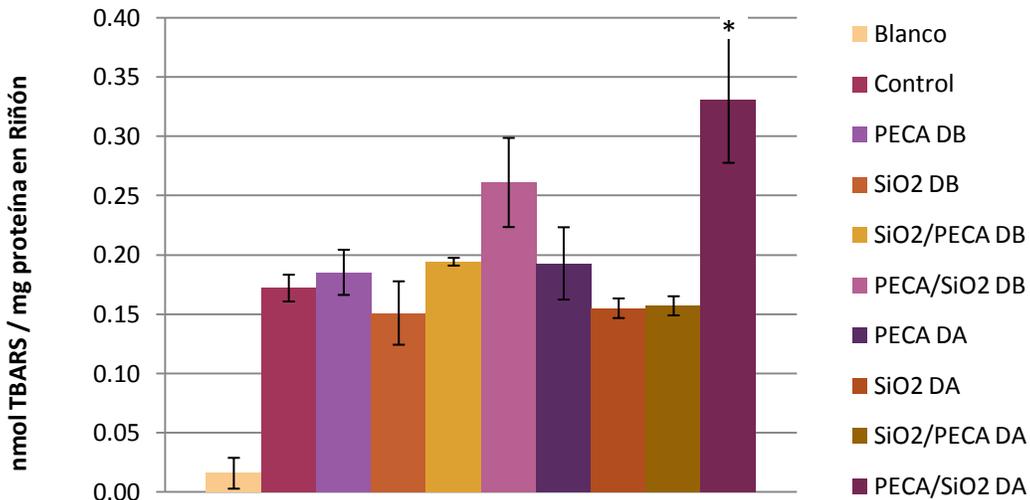


Fig. 35 "Concentración de TBARS en Riñón por cada tratamiento a dosis baja (DB) y alta (DA)"

Por último, estos resultados resaltan que el riñón es el órgano más susceptible al tratamiento de nanopartículas. Todos los sistemas nanoparticulados presentan una marcada elevación en los niveles de TBARS y el sistema híbrido de PECA/SiO₂ es el que más daño oxidativo causa.

6.3.1 Comparación de Medias entre grupos

Para corroborar que los resultados tuvieran un efecto significativo se realizó un análisis estadístico por ANOVA y se determinaron diferencias significativas por el método de Tukey a un 95 % de confianza. Los gráficos se encuentran en el ANEXO II, así como las tablas donde se señalan los grupos que tienen diferencia significativa con respecto al blanco.

De acuerdo a la Tabla 6, se establece que la administración de sistemas nanoparticulados de SiO₂ y PECA, así como los híbridos resultantes de su combinación, SiO₂/PECA y PECA/SiO₂, van a causar un efecto significativo sobre las concentraciones de GSH y TBARS en plasma, hígado y riñón de rata Wistar.

Tabla 6 "ANOVAS resultantes en la Fig. 48".

| | GSH | MDA |
|--------|--------|--------|
| PLASMA | 0.0134 | |
| HÍGADO | 0.0000 | 0.0000 |
| RIÑÓN | 0.0000 | 0.0001 |

Tabla 7 "Resumen de los Tratamientos que tuvieron diferencia significativa en la Fig. 48 "Resultados del Análisis de Varianza por Tukey HSD a un 95% de confianza de las pruebas de citotoxicidad para determinar el Efecto del Tratamiento en las concentraciones de MDA en Hígado (c.) y Riñón (e.); así como de GSH en Plasma (a.), Hígado (b.) y Riñón (c.)"

| | | PLASMA | | HÍGADO | | RIÑÓN | |
|------------------------|----|--------|-----|--------|-----|-------|-----|
| | | GSH | MDA | GSH | MDA | GSH | MDA |
| PECA | DB | | | | | ✓ | ✓ |
| | DA | | | | | ✓ | ✓ |
| SiO ₂ | DB | | | | | | |
| | DA | ✓ | | | | ✓ | |
| SiO ₂ /PECA | DB | | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | DA | ✓ | | ✓ | | ✓ | |
| PECA/SiO ₂ | DB | | | ✓ | | | ✓ |
| | DA | | | ✓ | | | ✓ |

✓ Sistema que presenta diferencia significativa solo con respecto al blanco

La Tabla 7 muestra los sistemas que tienen diferencia significativa con respecto al blanco en sus dos diferentes dosis. En hígado sólo los sistemas híbridos tienen efecto significativo. Y el riñón resulta ser el más sensible al tratamiento de PECA ya que ambos parámetros se encuentran elevados en ambas dosis.

Por otro lado, se hizo la comparación estadística agrupando todos los tratamientos en Dosis Bajas y Dosis Altas por separado, contra el blanco. Esto para determinar el efecto de la composición de cada sistema nanoparticulado.

Tabla 8 "ANOVAS obtenidas tras el análisis estadístico entre tratamientos referidos en la Fig. 49 (Plasma) Fig. 50 (Hígado) y Fig. 51 (Riñón)"

| | GSH | | TBARS | |
|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Baja | Alta | Baja | Alta |
| Plasma | 0.0001 | 0.0654 | | |
| Hígado | 0.0001 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0084 |
| Riñón | 0.0003 | 0.0000 | 0.0005 | 0.0012 |

Los resultados de los ANOVAS muestran que todos los tratamientos de sistemas nanoparticulados tienen un efecto significativo sobre las concentraciones de GSH y TBARS con respecto al blanco en hígado y riñón. En el caso del plasma, solo se muestra efecto significativo en el grupo de Dosis bajas.

Tabla 9 "Resumen de los resultados en los que se observa una diferencia significativa en los tratamientos administrados en la Fig. 49 (Plasma) Fig. 50 (Hígado) y Fig. 51 (Riñón)"

| | | Control | PECA | | SiO ₂ | | SiO ₂ /PECA | | PECA/SiO ₂ | |
|--------|-------|---------|------|----|------------------|----|------------------------|----|-----------------------|----|
| | | | DB | DA | DB | DA | DB | DA | DB | DA |
| Plasma | GSH | ✓ | ✓ | | ✓ | ✓ | ✓ | | | |
| | TBARS | | | | | | | | | |
| Hígado | GSH | | | | | | | ★ | ★ | ★ |
| | TBARS | | | | | ✓ | ★ | | | |
| Riñón | GSH | | ★ | ★ | | ★ | ★ | | | ★ |
| | TBARS | ✓ | ✓ | | ✓ | | ✓ | | ✓ | ★ |

✓ Sistema que presenta diferencia significativa solo con respecto al blanco

★ Sistema que presenta diferencia significativa entre tratamientos

Son los sistemas híbridos los que ejercen un efecto significativo en las concentraciones de GSH en hígado, destacando el de PECA/SiO₂ (a, b; Fig. 50 del anexo 10.4), queda claro que la combinación de estos materiales les confirió propiedades fisicoquímicas características atribuidos al posible arreglo estructural adquirido durante su preparación. Esto se pudo manifestar en sus propiedades de superficie, carga, núcleo de la nanopartícula, etc. En cuanto a las concentraciones de TBARS, tanto el sistema de SiO₂ (d, Fig. 50 del anexo 10.4), como el híbrido (c, Fig. 50, del anexo 10.4), SiO₂/PECA ejercen un efecto significativo con respecto al blanco. Al variar el **orden de adición** puede que uno de los materiales en la superficie como un tipo de recubrimiento. Con esto, se seguiría la lógica de que muestre un comportamiento similar al de los sistemas simples (PECA y SiO₂), sin embargo esto no es así, con lo que se puede atribuir el comportamiento de la nanopartícula al núcleo. (Khan, Nigavekar, Minc, Kariapper, Nair, & Lesniak, 2005)

Por último, se confirma que el riñón es el órgano más sensible al tratamiento con sistemas nanoparticulados; este efecto también se observa para el sistema "control" medio de dispersión de las nanopartículas, lo cual es importante a contemplar en la fabricación de sistemas nanoparticulados con fines biomédicos, ya que todos los materiales idealmente deben ser inocuos.

Se debe considerar que los componentes del medio también pueden tener un efecto característico. De acuerdo a Kavanov y colab., (2002) el Pluronic® tiene la capacidad de modificar el comportamiento de células MDR, alterando su flujo y los mecanismos de detoxificación. Este efecto, afirma el artículo, solo se aprecia en células cancerígenas y no en las normales, sin embargo, no está por demás considerar que este tensoactivo por sí solo altera de una forma u otra los mecanismos de la célula. Es sabido que los copolímeros de Pluronic® inducen cambios drásticos en la microviscosidad de las membranas celulares; estos pueden ser atribuidos a las alteraciones en la adsorción de las moléculas de copolímeros en las membranas. Estudios recientes demostraron que la exposición a este copolímero, resulta en la fluidez de las membranas celulares tanto de células normales

como cancerígenas que expresan altos niveles de glicoproteína P "P-glycoprotein" (Pgp) (Kabanov, Batrakova, & Alakhov, 2002). En el caso de los sistemas nanoparticulados usados, el medio solo contiene ácido acético y Pluronic®.

Cabe señalar que se esperaba una mayor respuesta por parte del hígado con respecto al tratamiento de PECA ya que según Fernández Urrusono y colab. (1995)0, las nanopartículas de polialquil cianoacrilato (PACA) son captadas por las células del sistema reticuloendotelial (células de Kupffer en particular) acumulándose y provocando daño; sin embargo los resultados obtenidos, no muestran mucha variación con respecto a los blancos de Hígado. Sus evaluaciones mostraron que los productos de degradación del PECA no produjeron un efecto tóxico *in vivo*, sin embargo, en riñón no realizaron evaluación alguna.

Como ya se mencionó en el marco teórico, los productos de degradación del polialquil cianoacrilato (PACA) pueden ser el formaldehído y el cianoacetato, (Fig. 36, a) o ácido policianoacrílico y alcohol (Fig. 36, b).

Es importante considerar que a su vez, estos metabolitos son degradados, por ejemplo, el ácido fórmico que se forma (

Fig. 37; A, B,C) en la degradación del formaldehído, es eliminado por orina. Tomando en cuenta que, en general, los diferentes metabolitos formados van a formar parte de diferentes reacciones para su completa degradación, desde las más simples (oxidación, reducción, hidrólisis: fase I), hasta las de fase II (conjugación con moléculas endógenas como GSH por ejemplo) para formar especies hidrosolubles y ser finalmente eliminadas por orina o heces.

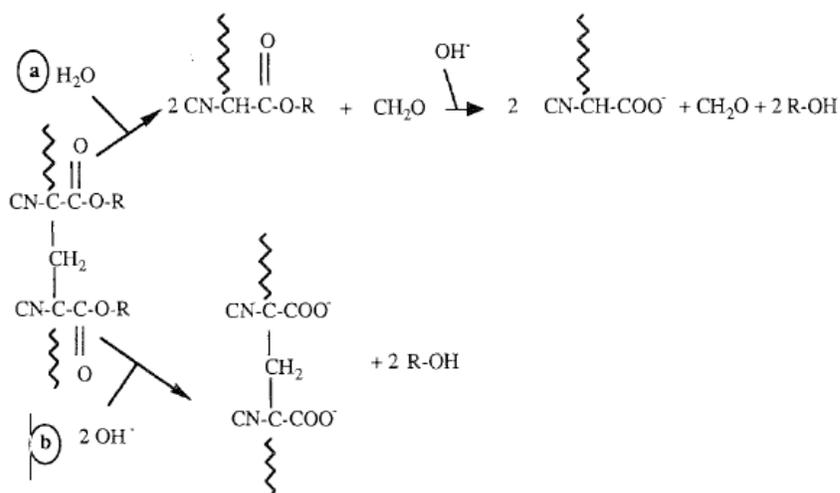


Fig. 36 "Mecanismos de degradación del polialquil cianoacrilato: a) hidrólisis de del enlace C – C con la formación de formaldehído y cianoacetato. B) hidrólisis del grupo ester con la formación de fracciones ácidas (a. policianoacrílico) y alcohol. (Fattal , Peracchia, & COUV, 1997)

El MDA también sufre de catabolismo *in vivo*, generando otros productos e intermediarios, que probablemente, al aumentar su concentración provoquen un desequilibrio que a la larga se manifieste como un daño celular (Fig. 39).

Nanotoxicología

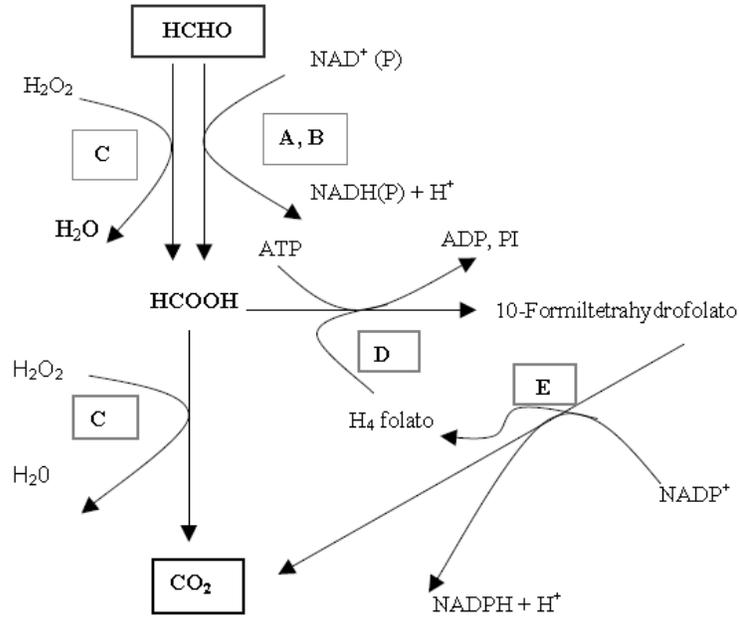


Fig. 37 "Diferentes vías de biotransformación del formaldehído: A. formaldehído deshidrogenasa dependiente de GSH, B. aldehído deshidrogenasa, C. la catalasa. D. 10-formiltetrahidrofolato sintasa, E. 10-formiltetrahidrofolato deshidrogenasa. (Achkar, 2003)

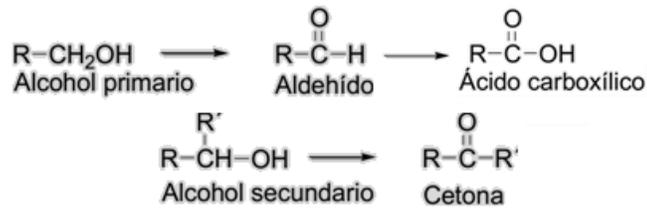


Fig. 38 "Reacciones de deshidrogenación, para la formación de sustancias más hidrosolubles"

Lo que se trata de **remarcar** es que el efecto de las Nanopartículas puede no ser sólo a causa del estrés oxidativo que provocan, sino también por la formación de sustancias (intermediarios y productos de reacción) que alteren el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes.

Nanotoxicología

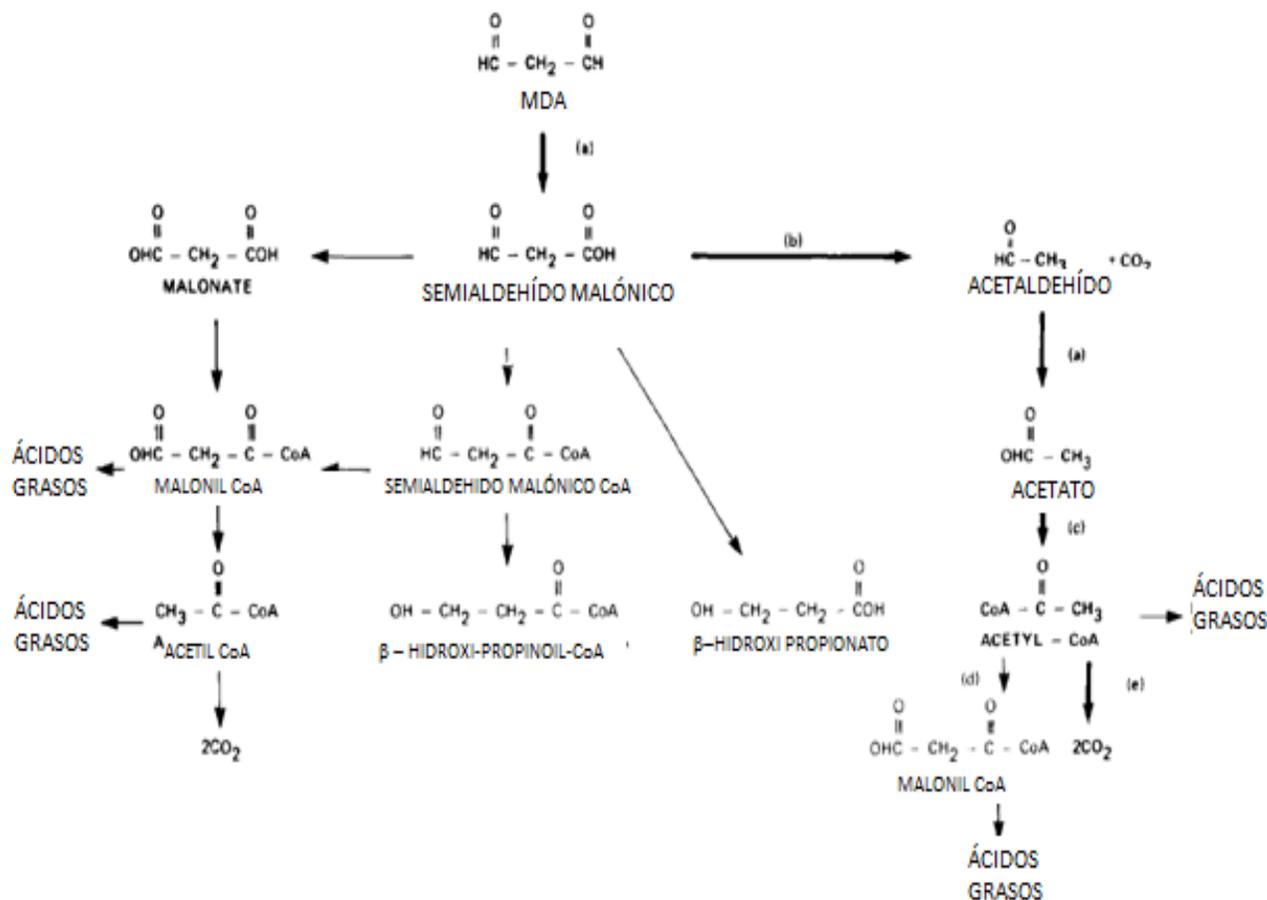


Fig. 39 "Rutas del catabolismo de MDA in vivo. La ruta predominante involucra al semialdehído malónico y acetaldehído como intermediarios y al CO₂. Las enzimas/caminos metabólicos en la transformación de MDA a CO₂ o intermediarios de Co-A del semialdehído malónico son: (a) aldehído deshidrogenasa, (b) descarboxilasa, (c) acetil-CoA sintetasa, (d) acetil-CoA carboxilasa, (e) ciclo del ácido tricarboxílico" (Janero, 1990).

Por último se analizó el efecto de la dosis administrada por cada tratamiento nanoparticulado en plasma, hígado y riñón.

Tabla 10 "ANOVAS resultantes de las Fig. 52(Plasma), Fig. 53 (Hígado) y Fig. 54 (Riñón), que determinan si la dosis tiene un efecto significativo a una $p < 0.05$ "

| | PLASMA | | HÍGADO | | RIÑÓN | |
|------------------------|--------|-----|--------|--------|--------|--------|
| | GSH | MDA | GSH | MDA | GSH | MDA |
| PECA | 0.0134 | / | 0.2845 | 0.0019 | 0.0000 | 0.0019 |
| SiO ₂ | 0.0268 | | 0.4090 | 0.0187 | 0.0072 | 0.0025 |
| SiO ₂ /PECA | 0.0021 | | 0.0100 | 0.0000 | 0.0040 | 0.0000 |
| PECA/SiO ₂ | 0.0021 | | 0.0012 | 0.6613 | 0.2069 | 0.0056 |

Aquí resalta otro punto a tratar, normalmente se tiene la idea "lógica" de que son las dosis (concentraciones) mayores las que provocan más respuesta/efecto/daño en el organismo. Sin embargo, se ha demostrado que una de las características del "mundo nanoparticulado" es que no siguen un comportamiento predecible. Un factor muy importante es el tamaño de partícula, pero también se involucra el tiempo de exposición, las propiedades de superficie que tengan pues van a determinar la capacidad de captación por parte de las células, su posible acumulación y por lo tanto la interacción con la célula y sus organelos.

Uno de los principales atributos de las nanopartículas es presentan tiempos de vida prolongados en el organismo. Debido al tamaño tan pequeño, pueden “evadir” el sistema inmune y de esta forma mermar los tiempos de eliminación.

Los resultados de la Tabla 10 muestran que el efecto no depende de la dosis en todos los sistemas. Aunque lo ideal para determinar esto completamente hubiese sido establecer una curva dosis – efecto; sin embargo permite abrir un panorama sobre el comportamiento de estos sistemas.

Tabla 11 "Resumen de los resultados en los que se observa una diferencia significativa en la Dosis en la Fig. 52 (Plasma), Fig. 53 (Hígado) y Fig. 54 (Riñón)".

| | | PLASMA | | HÍGADO | | RIÑÓN | |
|-----------------------------|---------|--------|-----|--------|-----|-------|-----|
| | | GSH | MDA | GSH | MDA | GSH | MDA |
| PECA | Control | | | | | | |
| | DB | | | | | ★ | ✓ |
| | DA | ✓ | | | ✓ | ★ | ✓ |
| SiO₂ | Control | | | | | | |
| | DB | | | | | | ✓ |
| | DA | ✓ | | | ✓ | ★ | ✓ |
| SiO₂/PECA | Control | ✓ | | | | ✓ | |
| | DB | ✓ | | ✓ | ★ | ✓ | ✓ |
| | DA | ✓ | | ✓ | | ✓ | ★ |
| PECA/SiO₂ | Control | ✓ | | | | | |
| | DB | | | ★ | | ✓ | |
| | DA | ✓ | | ★ | | ✓ | |

✓ Sistema que presenta diferencia significativa solo con respecto al blanco

★ Sistema que presenta diferencia significativa entre tratamientos (con respecto al control y/o la dosis).

En la tabla 11 se puede apreciar que la mayoría de las dosis altas son las que causan un efecto significativo en la elevación de las concentraciones de GSH y TBARS, sin embargo, esto se aprecia mejor en los gráficos de las Fig. 52 a la Fig. 54 del ANEXO II.

La elevación en la concentración de GSH parece ser dosis – dependiente en plasma y riñón. En el caso del MDA solo se aprecia esto en el sistema SiO₂ en hígado y PECA/SiO₂ en riñón.

En el caso del sistema híbrido SiO₂/PECA es la dosis baja la que causa un efecto significativo mayor en las concentraciones de GSH en riñón y plasma, también lo causa en las concentraciones de TBARS en hígado. Se aprecia el mismo comportamiento por parte del sistema PECA/SiO₂ en Hígado pero solo en la concentración de GSH.

Tomando en cuenta que en algunos resultados, fueron las dosis bajas las que provocaron una mayor respuesta, se puede atribuir a que el organismo normalmente reacciona ante altas concentraciones de xenobiótico, estimulando la producción de células inmunes que encapsulen y lo eliminen. Existe la posibilidad de que al administrar nanopartículas en pequeñas dosis, el sistema inmune tarde aún más en detectarlas y, por ende, a eliminarlas.

También pudo deberse a que la cuantificación se haya llevado a cabo en el momento en que los sistemas antioxidantes ya hayan ejercido su efecto sobre los niveles altos de MDA, y por esto se aprecien en menor cantidad incluso contra el blanco, como se puede ver en el sistema SiO₂/PECA en TBARS en hígado y riñón, PECA/SiO₂ en GSH en hígado (f, Fig. 53 y f, Fig. 55 del anexo 10.4.1, respectivamente).

Con este trabajo confirmamos que, a pesar de que el tratamiento va a producir efectos en los órganos, estos no pueden predecirse ni extrapolarse, ya que cada **nanopartícula** tiene un comportamiento individual, y este comportamiento va a depender de sus propiedades fisicoquímicas. La caracterización **no** puede hacerse en rangos generales, se deben establecer los efectos citotóxicos por cada sistema nanoparticulado tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas: tamaño de partícula, potencial Z (en un medio determinado) que adquieren de acuerdo al material (es) y a la estrategia de preparación.

7 CONCLUSIONES

Obtuvimos sistemas nanoparticulados únicos e híbridos a base de SiO₂ y PECA, que al caracterizarlos por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM), Microscopía de Electrónica de Barrido (SEM), tamaño de partícula y potencial Z; se corroboró que el tiempo y el orden de adición son variables críticas que le atribuyeron características fisicoquímicas diferentes a las nanopartículas, las cuales influyeron en su potencial citotóxico.

Se realizó un diseño experimental por medio del cual se evaluó la citotoxicidad *in vivo* en ratas Wistar macho expuestas por vía intraperitoneal a sistemas nanoparticulados de diferente composición: Polietil cianoacrilato (PECA) y Dióxido de Silicio (SiO₂), la mezcla de éstos (sistemas híbridos), así como el efecto de la dosis.

Esta citotoxicidad se asocia al estrés oxidativo generado tras la formación de radicales libres provocados por la interacción con los sistemas nanoparticulados; la cual se determinó de manera indirecta por la estimación de Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) y el Glutatión (GSH) en plasma, hígado y riñón; las diferencias en su concentración con respecto a los basales, son indicadores indirecto (TBARS) y directo (GSH) de un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes en la célula.

Tras este estudio se pudo confirmar que la composición de cada sistema nanoparticulado le confiere un comportamiento diferencial en la respuesta asociada a la elevación de las concentraciones de TBARS y GSH misma que se puede asociar a su potencial citotóxico.

8 PERSPECTIVAS

Tras evaluar nanopartículas de PECA y SiO₂, se pudo determinar que el potencial citotóxico atribuido al estrés oxidativo provocado por la interacción de los órganos con los sistemas nanoparticulados, va a depender de las propiedades fisicoquímicas de cada sistema. Las cuales pueden modificarse al combinar materiales para la creación de sistemas híbridos o duales (SiO₂/PECA y PECA/SiO₂) y que al variar parámetros como orden y tiempo de adición, le atribuirán propiedades características a cada nanopartícula.

Dado la complejidad de los sistemas nanoparticulados, sería bueno contemplar una serie de estudios multidisciplinarios que ayuden a determinar todas las propiedades fisicoquímicas que le confiere la estrategia de fabricación; de manera que se pueda establecer o atribuir directamente la influencia de cada característica a su comportamiento en los organismos vivos.

Una vez que se determinen todas las características fisicoquímicas, será necesario el estudio biológico que contemple pruebas cito y genotóxicas in vivo e in vitro, sin descartar unas de otras ni asumiendo comportamientos hasta que se tenga un pleno conocimiento de los mecanismos cinéticos que determinen la interacción con los diferentes tipos celulares. Estudios histopatológicos ayudaran a corroborar la afinidad que tengan estos sistemas por un órgano en particular, así como corroborar los tiempos de vida.

Todo esto es lo que debe englobar la nanocaracterización, cuando se tenga establecida ya se podrá determinar el uso que se le puede usar a cada nanopartícula de cierto material, tamaño y estructura determinadas.

Feynman señaló que los sistemas biológicos han estado produciendo dispositivos funcionales nanométricos desde el inicio de la vida, y falta mucho que aprender de la Biología sobre cómo construir dispositivos nanoestructurados.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Achkor, H. (2003). *Estudio funcional de la formaldehído deshidrogenasa dependiente del Glutatión de ARABIDOPSIS THALIANA. Aplicaciones en Fitoremediación.* Cerdanyola, Bellaterra.

- AL-QADI, S., & Remuñán-López, C. (s.f.). *Nanopartículas metálicas: Oro*. Recuperado el 12 de agosto de 2012, de <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/994/1028>
- Arenas, C., Rangel, D., Castaño, V. M., Loa, E., & Vega, M. (2010). Sensores piezoeléctricos de fluoruro de polivinilideno modificado con nanopartículas de sílice para aplicaciones en MEMS. *Redalyc* , 20-25.
- Balbus, J. M., Maynard, A. D., Colvin, V. L., Castranova, V., Daston, G. P., Denison, R. A., y otros. (2007). Meeting Report: Hazard Assessment for Nanoparticles - Report from an Interdisciplinary Workshop. *Environmental Health Perspectives* , 1654 - 1659.
- Ballou, B., Langerholm, B., Ernst, L., Bruchez, M., & Waggoner, A. (2004). Noninvasive imaging of Quantum Dots in Mice. *Bioconjug Chem* , 79-86.
- Baxterretxea, M. d. (2006). *La modulación selectiva de los niveles de Glutación con L-2-OXO Tiazolidina carboxilato aumenta la eficacia de la Interleucina 2 e incrementa el beneficio terapéutico de la bioquimioterapia del melanoma metastático*. Leioa: Tesis doctoral. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco.
- Born, P., Klaessing, F., Landry, T., Moundgil, B., Pauluhn, J., & Thomas, K. (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part V: Role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicological Sciences* , 23-32.
- C de Vardiere, A., Dubernet, C., Némati, F., Soma, E., Appel, M., Ferté, J., y otros. (1997). Reversion of multidrug resistance with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: towards a mechanism of action. *British Journal of Cancer* , 198-205.
- Castillo. (2001). *Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición*. Recuperado el 2012 de mayo de 2012, de . Arch. med. vet. [online]. 2001, vol.33, n.1: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2001000100001&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0301-732X. doi: 10.4067/S0301-732X2001000100001.
- CASTILLO, C., BENEDITO, J., LÓPEZ-ALONSO, M., MIRANDA, M., & HERNANDEZ, J. (2001). Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y nutrición. *Archivo Médico Veterinario [revista en la Internet]* URL: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2001000100001&script=sci_arttext , 5 - 20.
- Chean Wong, J. C. (2005). Ley de Moore, Nanotecnología y Nanociencias: Síntesis y modificación de nanopartículas mediante la implantación de iones. *Revista Digital Universitaria (en línea)* .
- De la Cruz Medina, M. (2010). *Preparación, caracterización y uso de Nanopartículas Farmacéuticas: Investigación Bibliográfica*. CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO: Tesis de licenciatura para obtener el Título de Q.F.B. FES-C, UNAM.
- Díaz Padilla, J. D. (2013). *Evaluación de la citotoxicidad inducida por Nanopartículas de SiO₂ (dióxido de silicio) y polietilcianoacrilato (PECA) in vitro*. CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO: Tesis de licenciatura para obtener el título de Q.F.B. FESC, UNAM.
- (1997). Handbook of Biodegradable Polymers Medical Reference and Soci and Delivery. En E. Fattal , M. Peracchia, & P. COUV, *POLY (ALKYL CYANOACRYLATES)* (pág. cap. 10). Amsterdam B.V.: OPA (Overseas Publishers Association).
- Fernandez Urrusono, R., Fattal, E., Porquet, D., Feger, J., & Couvreur, P. (1995). Evaluation of Liver Toxicological Effects Induced by Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* , 272-279.

- Flores Vivían, I. (2009). *Obtención de Nanopartículas de SiO₂ y su efecto en las propiedades microestructurales, mecánicas y reológicas en materiales cementantes*. Nuevo León: Tesis para obtener el título de Doctor en Ingeniería en Materiales de Construcción y estructuras. ITNL.
- Gasca Zacarías, B. C. (2011). *Evaluación de la capacidad Citotóxica de Sistemas Nanoparticulados de Quitosán y PECA*. CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO: Tesis de licenciatura para obtener el Título de Q.F.B. FES-C, UNAM.
- Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced Glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry* , 214-226.
- Janero, D. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine* , 515-540.
- Jiménez, L. F., & Merchant, H. (2003). *Biología Celular y Molecular*. En S. Castro Obregón, & L. F. Covarrubias Robles, *Muerte celular programada* (págs. 617 - 657). México, D. F.: Prentice Hall.
- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., & Alakhov, V. Y. (2002). Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 759-779.
- Khan, M., Nigavekar, S., Minc, L., Kariapper, M., Nair, B., & Lesniak, W. (2005). In vivo biodistribution of dendrimers and dendrimer nanocomposites - Implications for cancer imaging and therapy. *Technology in Cancer Research and Treatment* , 603-613.
- Konigsberg Fainstein, M. (2008). *Radicales Libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. México, D.F.: Manual Moderno.
- Kreuter, J. (2007). Nanoparticles -a historical perspective. (331), 1-10.
- Labhsetwar, V., & Leslie-Pelecky, D. L. (2007). Biomedical Applications of Nanotoxicology. En D. L. Leslie-Pelecky, *Nanotoxicology* (págs. 227 - 241). E. U. A.: John Wiley & Sons.
- Lapenna, D., Ciofani, G., Pierdomenico, S. D., Giamberardino, M. A., & Cucurullo, F. (2001). Reaction Conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radical Biology & Medicine* , 331-335.
- Lapenna, D., Ciofani, G., Pierdomenico, S. D., Giamberardino, M. A., & Cucurullo, F. (2001). Reaction Conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radical Biology & Medicine* , 331-335.
- Limón Pacheco, J., & Gonsbatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant - related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* , 137-147.
- López, P. (5 de enero de 2012). Diseñan en la UNAM dispositivo nanoestructurado con Silicio y Plata que amplifica la luz. *Boletín UNAM, CU* .
- Malsh, N. H. (2005). *Biomedical Nanotechnology*. U.S.: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Manahan, S. (2003). *Toxicological chemistry and biochemistry*. CRC.
- Márquez, S., & Zabala, E. (23 de 9 de 2011). *Genoma Sur*. Recuperado el 15 de 01 de 2013, de Respiración Celular: <http://www.genomasur.com/lecturas/Guia09.htm>

- Minjung, C., Wan-Seob, C., Mina, C., Sueng, J. K., Beom, S. H., Sheen, H. K., y otros. (2009). The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. *Toxicology Letters* , 177-183.
- Molécula, L. (8 de 2 de 2011). *Laciuda atómica*. Recuperado el 4 de abril de 2012, de laciudadatomica: http://laciudadatomica.blogspot.mx/2011_02_08_archive.html
- *Morfología Celular*. (mayo de 2010). Recuperado el 11 de abril de 2012, de Membranas: <http://ies.rayuela.mostoles.educa.madrid.org/deptos/dbiogeorecursos/Apuntes/ApuntesBioBach2/3-MorfoCelular/Indice.htm>
- Mozafari, M. R. (2007). Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications. En N. Hasirc, *Micro and Nano Systems in Biomedicine and Drug Delivery* (págs. 13-19). Dordrecht, The Netherlan: Springer.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic Potential of materials at the nanolevel. *Science* , 622-627.
- Némati, F., Dubernet, C., Fessi, H., Colin de Verdiere, A., Poupon, M., Puisieux, F., y otros. (1996). Reversion of multidrug resistane using nanoparticles in vitro: influence of the nature of the polymer. *International Journal of Pharmaceutics* , 237-246.
- Nicolas, J., & Couvreur, P. (2009). Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate) - based colloidal nanomedicine. *Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* , 111-127.
- P. Poole Jr., C., & Owens, F. J. (2003). *Introducción a la Nanotecnología*. España: Reverté.
- Pastor, E. L. (2008). *Contribución al Estudio del Comportamiento de Silicio Poroso Nanoestructurado en Fluidos Corporales Simulados para el desarrollo de nuevos materiales biocompatibles y biodegradables*. Valencia: Tesis Doctoral, Universidad de Valencia.
- Radwan, M. A., AlQuadeib, B. T., Aloudah, N., & Aboul Enein, H. Y. (2010). Pharmacokinetics of ketorolac loaded to polyethylcyanoacrylate nanoparticles usin UPLC MS/MS for its determination in rats. *International Journal of Pharmaceutics* , 173-178.
- Ramírez, A., Reyes, T., Liberona, L., Bustamente, A., Sáez, C., & Gisella, B. (2007). Metabolismo del glutatión y desarrollo posnatal del pulmón de la rata. *Rev Med Chile* , 896-903.
- Ramos, D., Gómez, M., Fernández, D., & Nuñez, L. (2007). Microesferas biodegradables de liberación controlada para la administración parenteral. *Rev. Cubana Farm.* , 34 (1).
- Rodríguez Perón, J. M., Menendez López, J. R., & Trujillo López, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev. Cub. Med. Mil.* , 15-20.
- Siems, W., & Grune, T. (2005). Lipid Peroxidation Measurements - Methodological Approaches and Clinical Importance. En T. Grune, *Free Radicals and Diseases, Gene Expression, Celular Metabolism and Pathophysiology* (págs. 11-19). U.S,A,: IOS Press.
- Singh, R., Pantarotto, D., L. L., Pastorin, G., Klumpp, C., & Prato, M. (2006). Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* , 3357-3362.
- Sohaebuddin, S. K., Thevenot, P. T., David, B., Eaton, J. W., & Tang, L. (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology* , 7-22.

- Vauthier, C., Dubernet, C., Chauvierre, C., Brigger, I., & Couvreur, P. (2003). Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly (alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Journal of Controlled Release* , 151-160.
- Vila Jato, J. L., & Calvo, P. (s.f.). *Aplicaciones Farmaterapéuticas*. Recuperado el 12 de agosto de 2012, de <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/995/1029>
- Vinod , L., & Diandra L. , L. P. (2007). Biomedical Applications of Nanotechnology. En L. P. Diandra L., *Nanotoxicology* (págs. 227-234). U.S.A.: John Wiley & Sons, Inc.
- Xie, G., Sun, J., Zhong, G., Shi, L., & Zhang, D. (2010). Biodistribution and toxicity of intravenously administered silidca nanoparticles in mice. *Arch. Toxicol* , 183-190.
- Yang, R., Chang, L., Wu, J., Tsai, M., Wang, H., & Kuo, Y. (2007). Persistent tissue kinetics and redistribution of nanopartciles, quantum Dot 705, in Mice; ICP-MS quantitative assessment. *Environ Health Perspect* , 1339-1343.
- *Zetasizer Nanoseries User Manual*. (2004). Inglaterra: Malvern Instruments.
- Zhao, Y., & Nalwa, H. S. (2007). *Nanotoxicology, interactions of Nanomaterials with Biological Systems*. U.S.A.: American Scientific Publishers.

10 ANEXOS

10.1 ANEXO I: INFORMACIÓN TEÓRICA COMPLEMENTARIA

10.1.1 Sistema del Glutatión

Tabla 12 "Concentración de GSH en diferentes órganos"

| Sistema | GSH | Relación GSH/GSSG | GPx |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------|----------|
| Rata | | | |
| Hígado | 7 – 8 mM | >10/1 | Alto |
| Eritrocito | 2 mM | >10/1 | Moderado |
| Corazón | 2 mM | >10/1 | Moderado |
| Pulmones | 2 mM | >10/1 | Moderado |
| Bazo | 4 a 5 mM | >10/1 | - |
| Riñón | 4 mM | >10/1 | Moderado |
| Cerebro | 2 mM | >10/1 | Moderado |
| Músculo esquelético | 1 mM | >10/1 | Bajo |
| Plasma sanguíneo | 20 a 30 μM | ~ 5/1 | Bajo |
| Tejido adiposo | 3.2 μM/10 ⁶ células | > 100/1 | Bajo |
| Tejido humano | | | |
| Hígado | 4 μmol/g de peso | >10/1 | Alto |
| Riñón | 2 μmol/g | >10/1 | Alto |
| Eritrocitos | 240 μmol/mL de sangre | >10/1 | Moderado |
| Sangre | ~ 1 mM | >10/1 | Alto |
| Plasma sanguíneo | 1 a 3 μM | Varía | Bajo |
| Factor surfactante alveolar | 40 a 200 μM | Varía (usualmente >10/1) | trazas |

(Konigsberg Fainstein, 2008)

10.2 ANEXO II - CARACTERIZACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL Z

Nanotoxicología

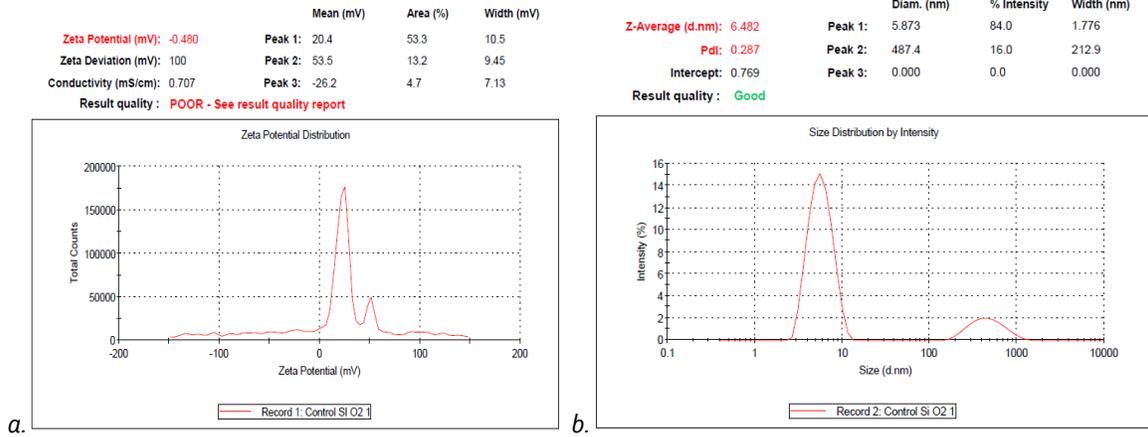


Fig. 40 "Resultados Potencial Z (a) y Tamaño de Partícula (b) de nanopartículas de SiO₂"

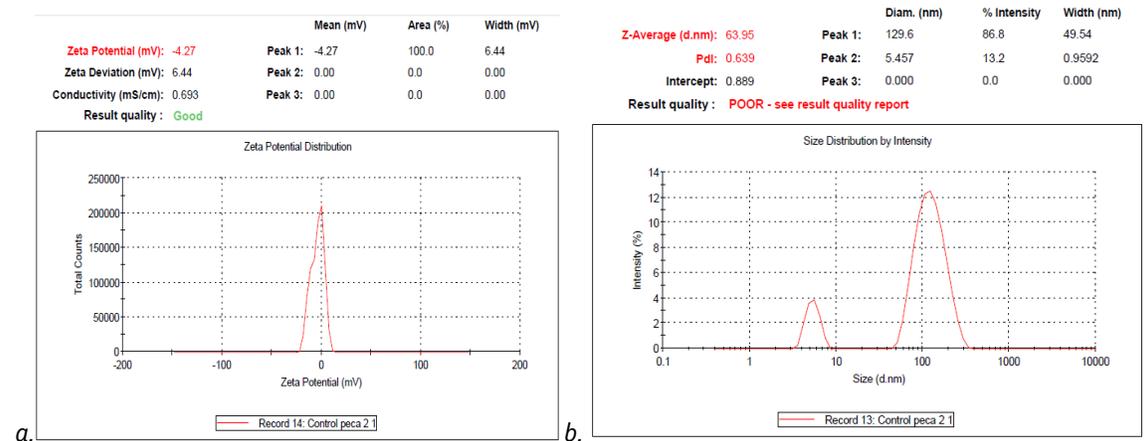


Fig. 41 "Resultados Potencial Z (a) y Tamaño de Partícula (b) de nanopartículas de PECA"

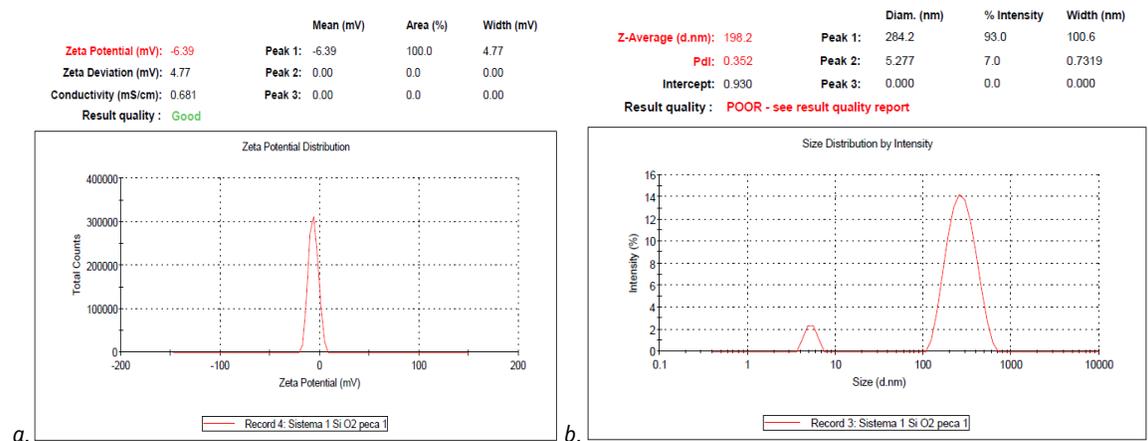


Fig. 42 "Resultados Potencial Z (a) y Tamaño de Partícula (b) de nanopartículas de SiO₂/PECA"

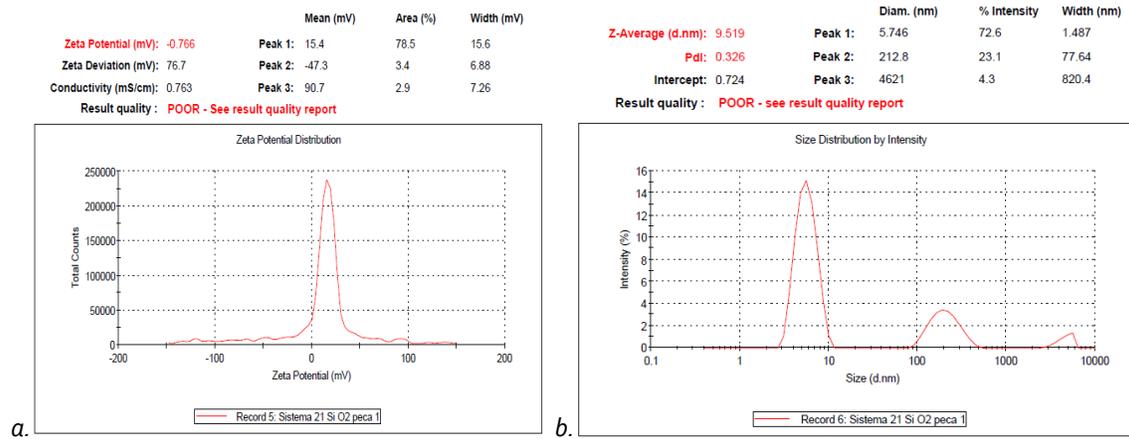


Fig. 43 "Resultados Potencial Z (a) y Tamaño de Partícula (b) de nanopartículas de 2.1 PECA/SiO₂"

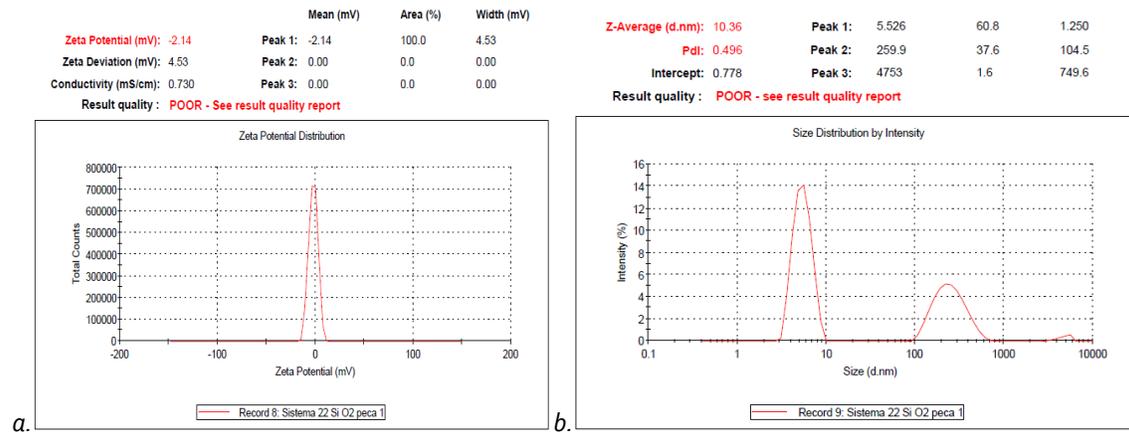


Fig. 44 "Resultados Potencial Z (a) y Tamaño de Partícula (b) de nanopartículas de 2.2 PECA/SiO₂"

10.3 ANEXO III: CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICAR LOS ÍNDICES DE CITOTOXICIDAD

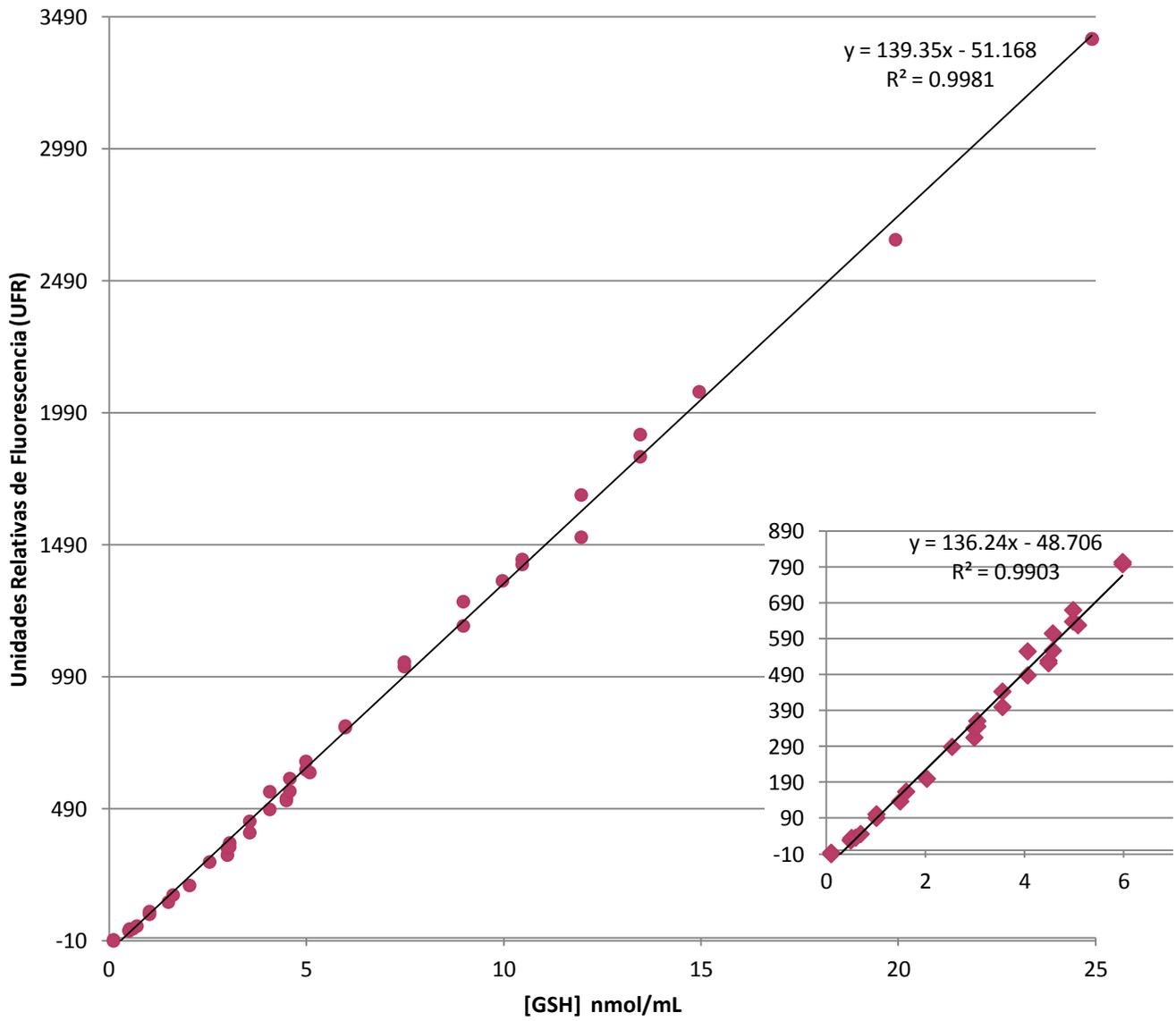


Fig. 45 "Gráfico de la Curva de calibración para la cuantificación de GSH (nmol/mL) por método fluorométrico"

Nanotoxicología

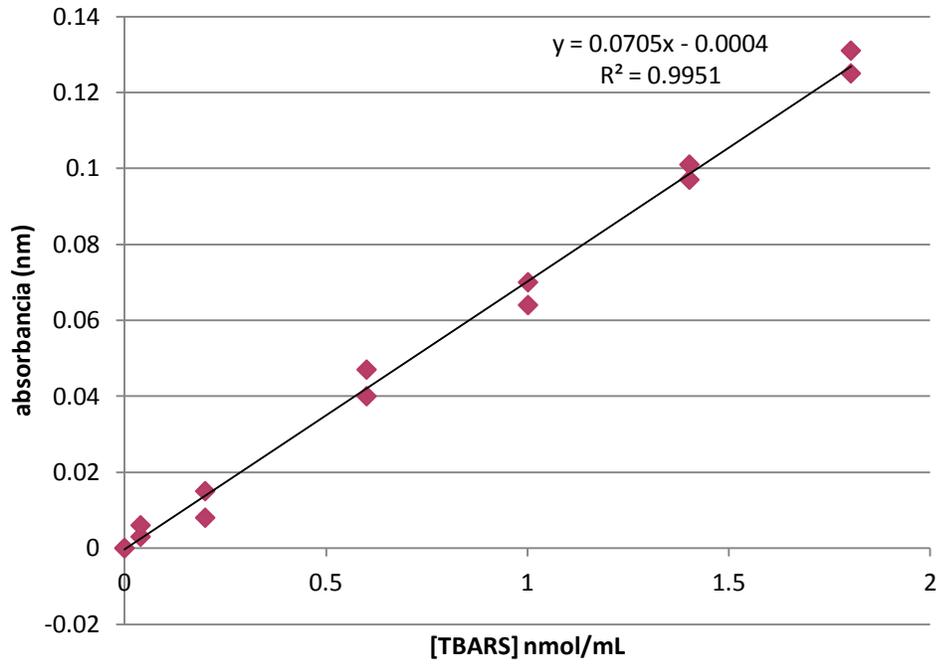


Fig. 46 "Gráfico de la Curva de Calibración para la cuantificación de TBARS (nmol MDA/mL) en lector de placa a 540nm"

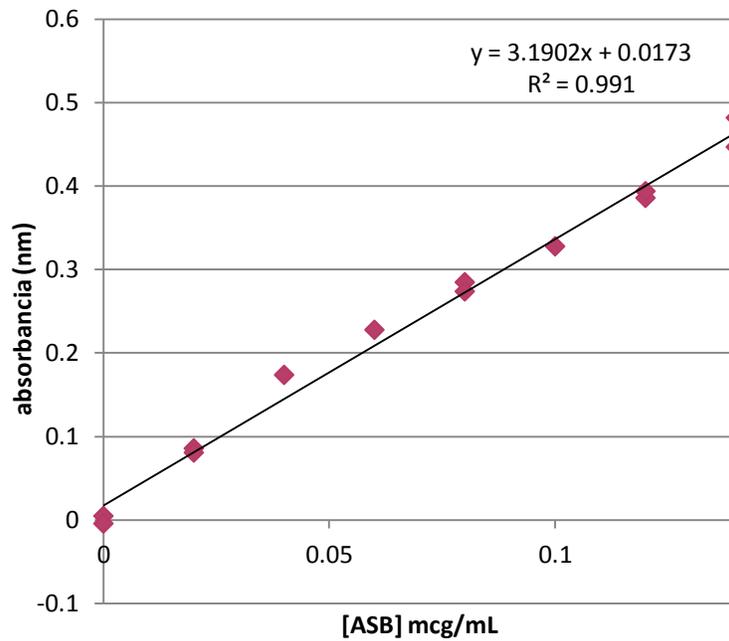


Fig. 47 "Gráfico de la Curva de Calibración para la cuantificación de proteínas (mcg ASB/mL) en lector de placa a 620 nm"

10.4 ANEXO III - ANÁLISIS ESTADÍSTICO

10.4.1 Gráficos de la Comparación de Medias

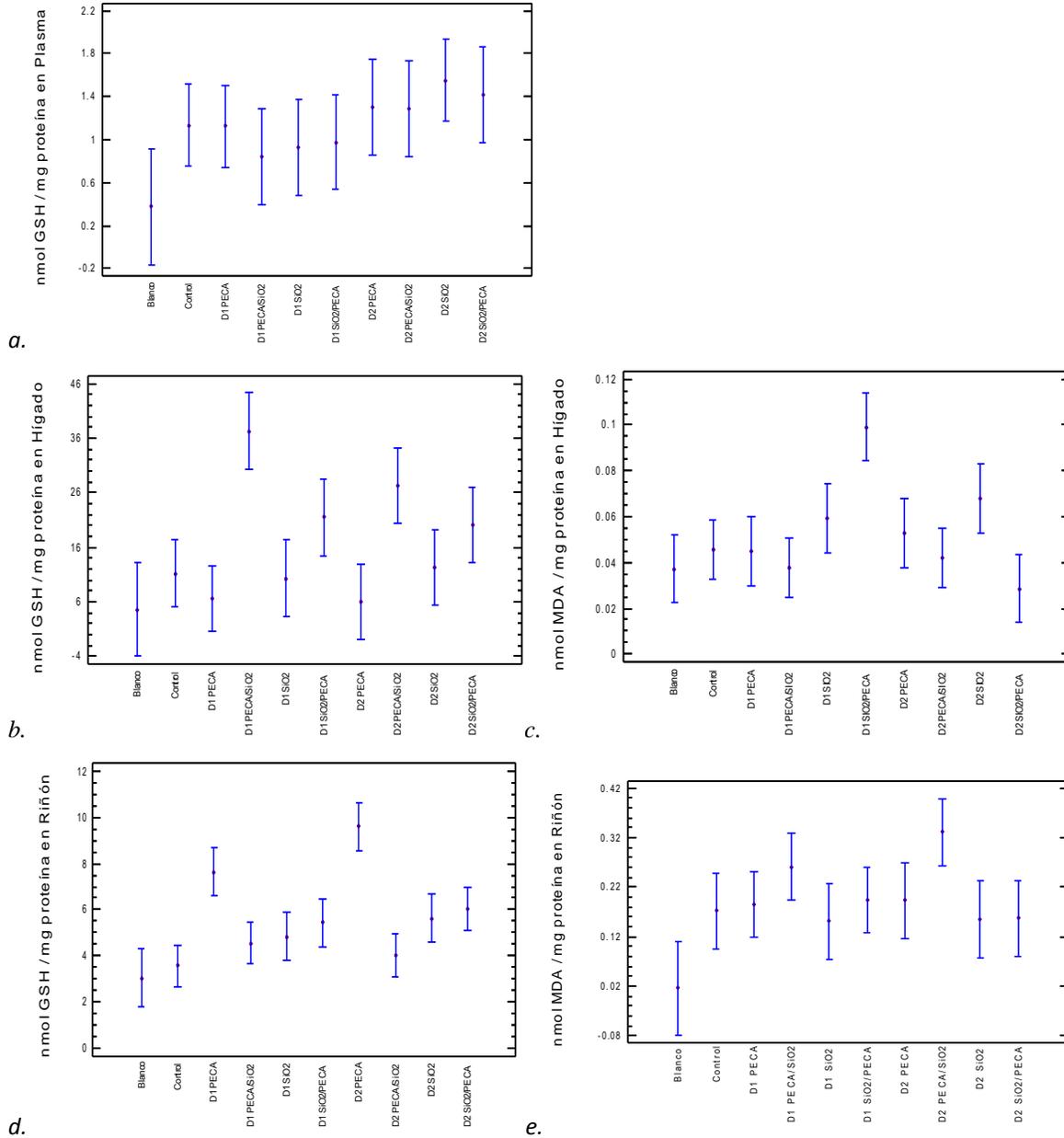


Fig. 48 "Resultados del Análisis de Varianza por Tukey HSD a un 95% de confianza de las pruebas de citotoxicidad para determinar el Efecto del Tratamiento en las concentraciones de MDA en Hígado (c.) y Riñón (e.); así como de GSH en Plasma (a.), Hígado (b.) y Riñón (c.)"

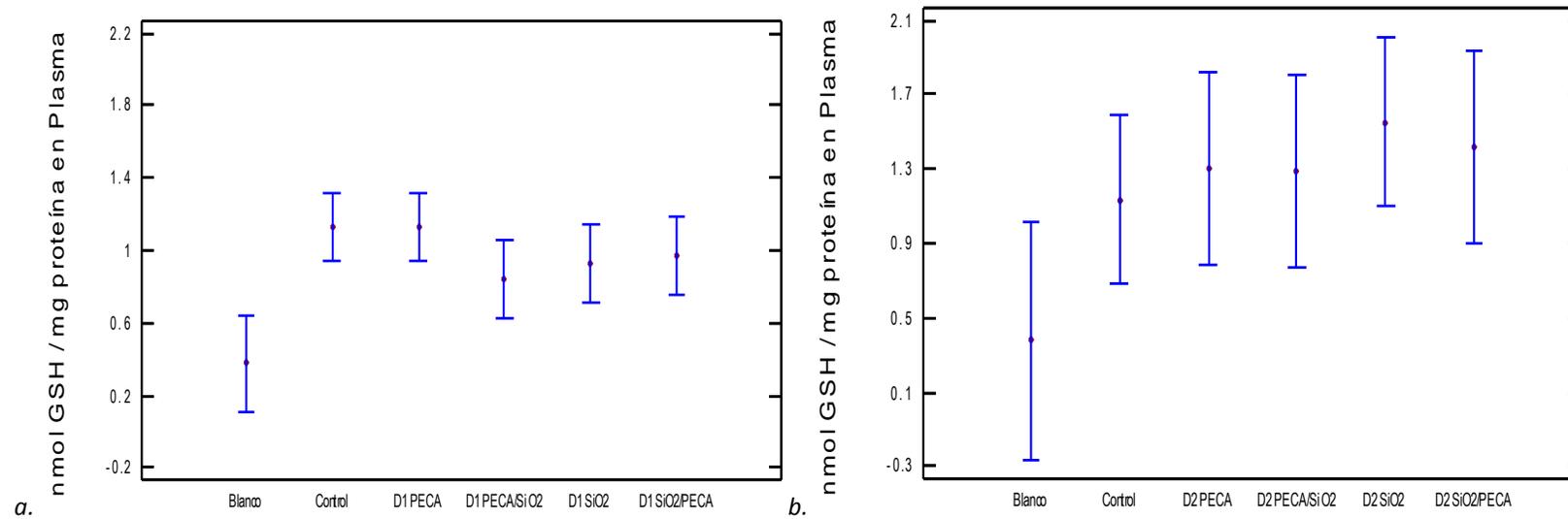


Fig. 49 "Resultados del Análisis de Varianza por Tukey HSD de las prueba de citotoxicidad de GSH en Plasma para determinar el Efecto de la composición de cada sistema nanoparticulado a Dosis bajas (a.) y Dosis altas (b.) de los diferentes tratamientos"

Nanotoxicología

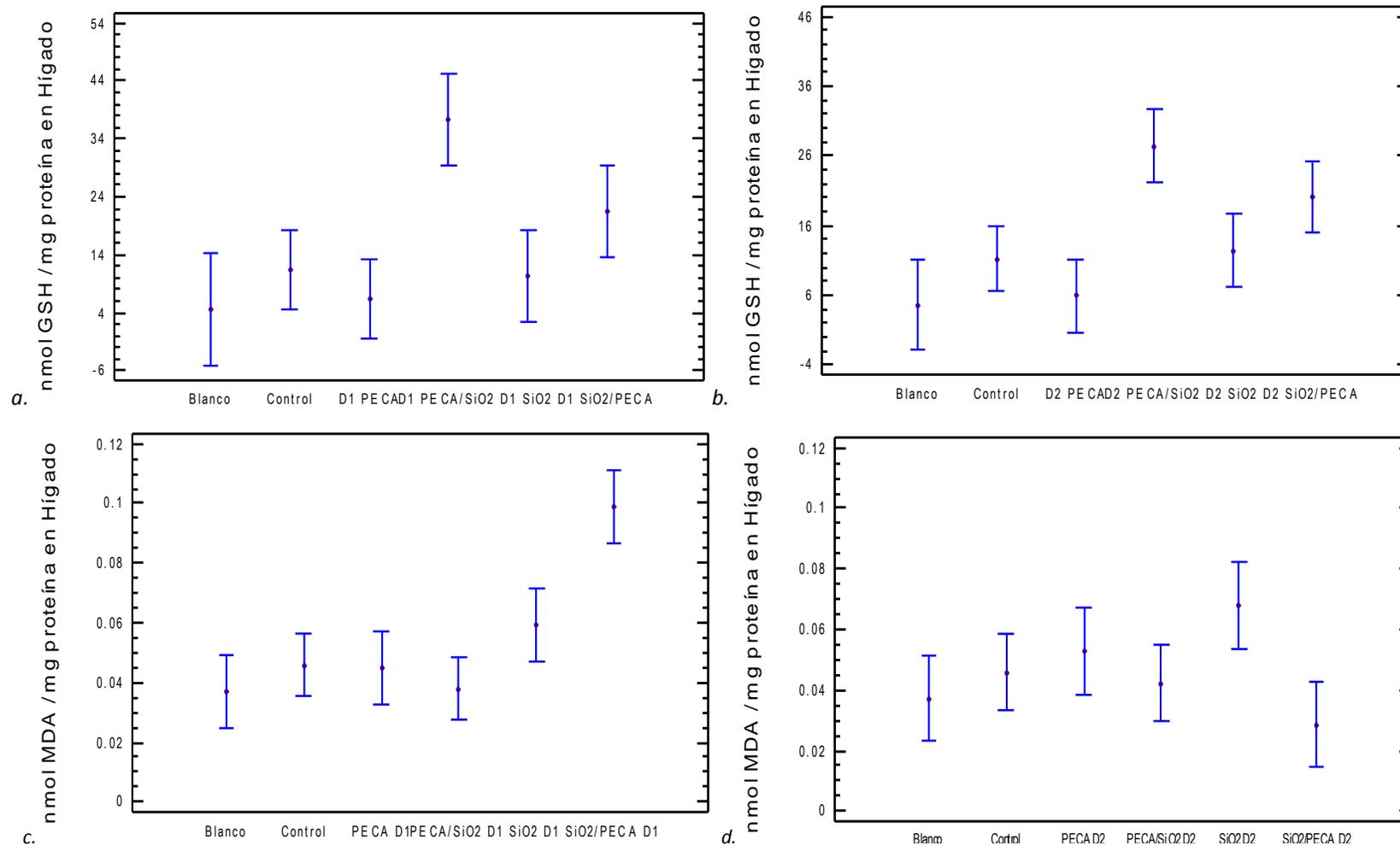


Fig. 50 "Resultados del Análisis de Varianza por Tukey HSD de las pruebas de citotoxicidad TBARS (a. y b.) y GSH (c. y d.) para determinar el Efecto de la composición de cada sistema nanoparticulado en Hígado a Dosis bajas (a. y c.) y Dosis altas (b. y d.) para los diferentes tratamientos"

Nanotoxicología

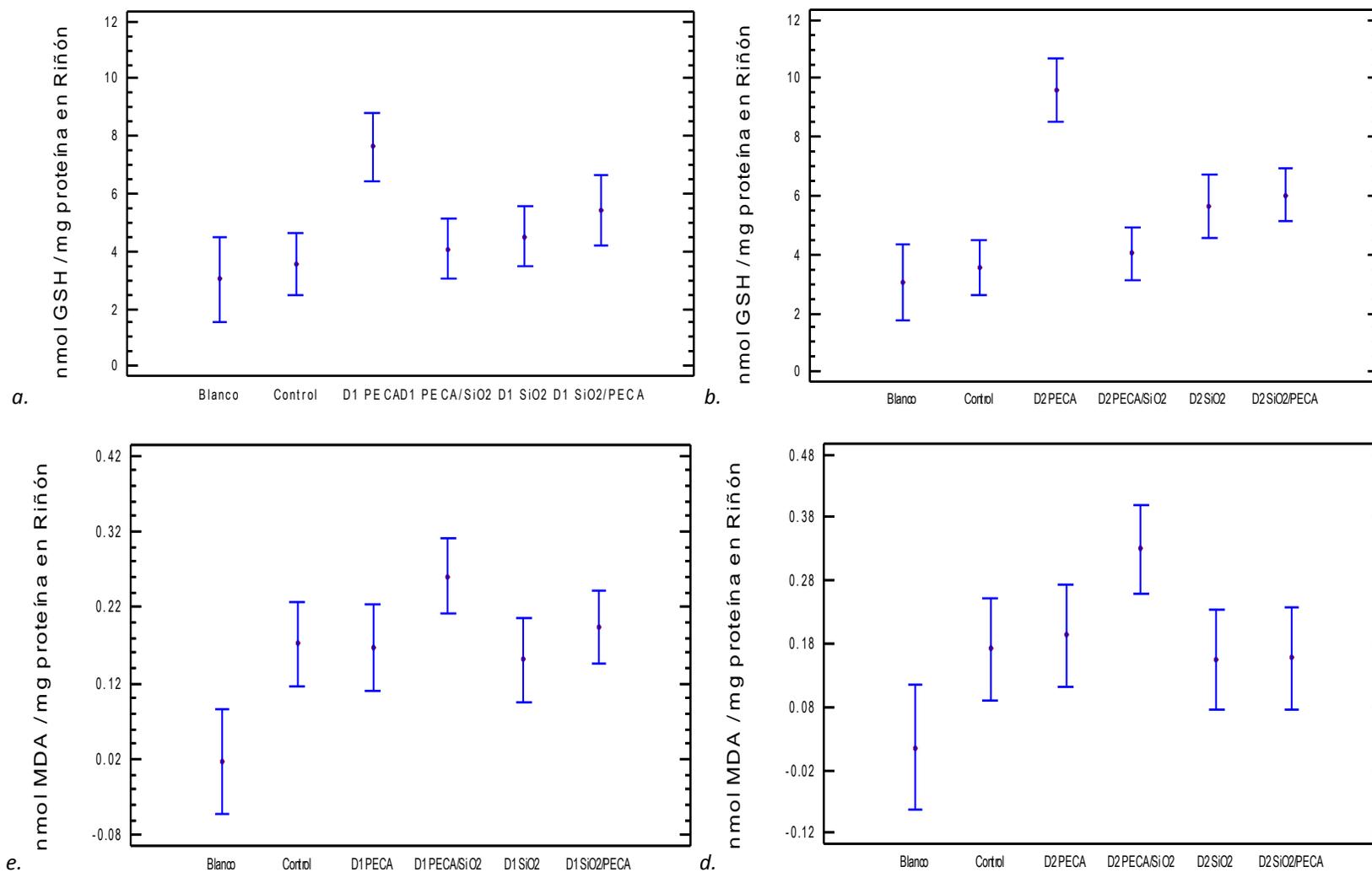


Fig. 51 "Resultados del Análisis de Varianza por Tukey HSD de las pruebas de citotoxicidad TBARS (a. y b.) y GSH (c. y d.) para determinar el Efecto de la composición de cada sistema nanoparticulado en Riñón a Dosis bajas (a. y c.) y Dosis altas (b. y d.) para los diferentes tratamientos"

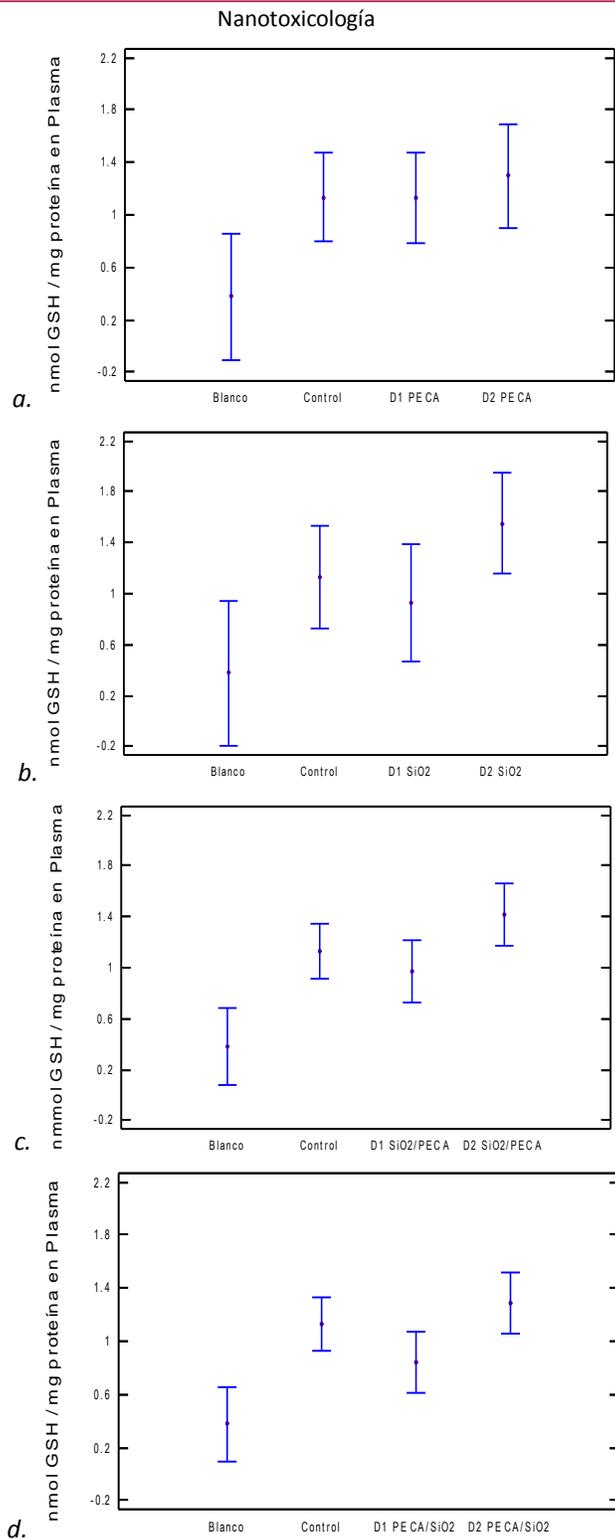


Fig. 52 "Resultados del Análisis de Varianza por Tukey HSD de las pruebas de citotoxicidad para determinar el Efecto de la Dosis por cada sistema nanoparticulado PECA (a.), SiO₂ (b.), SiO₂/PECA (c.) y PECA/SiO₂ (d.) en las concentraciones de GSH en Plasma"

Nanotoxicología

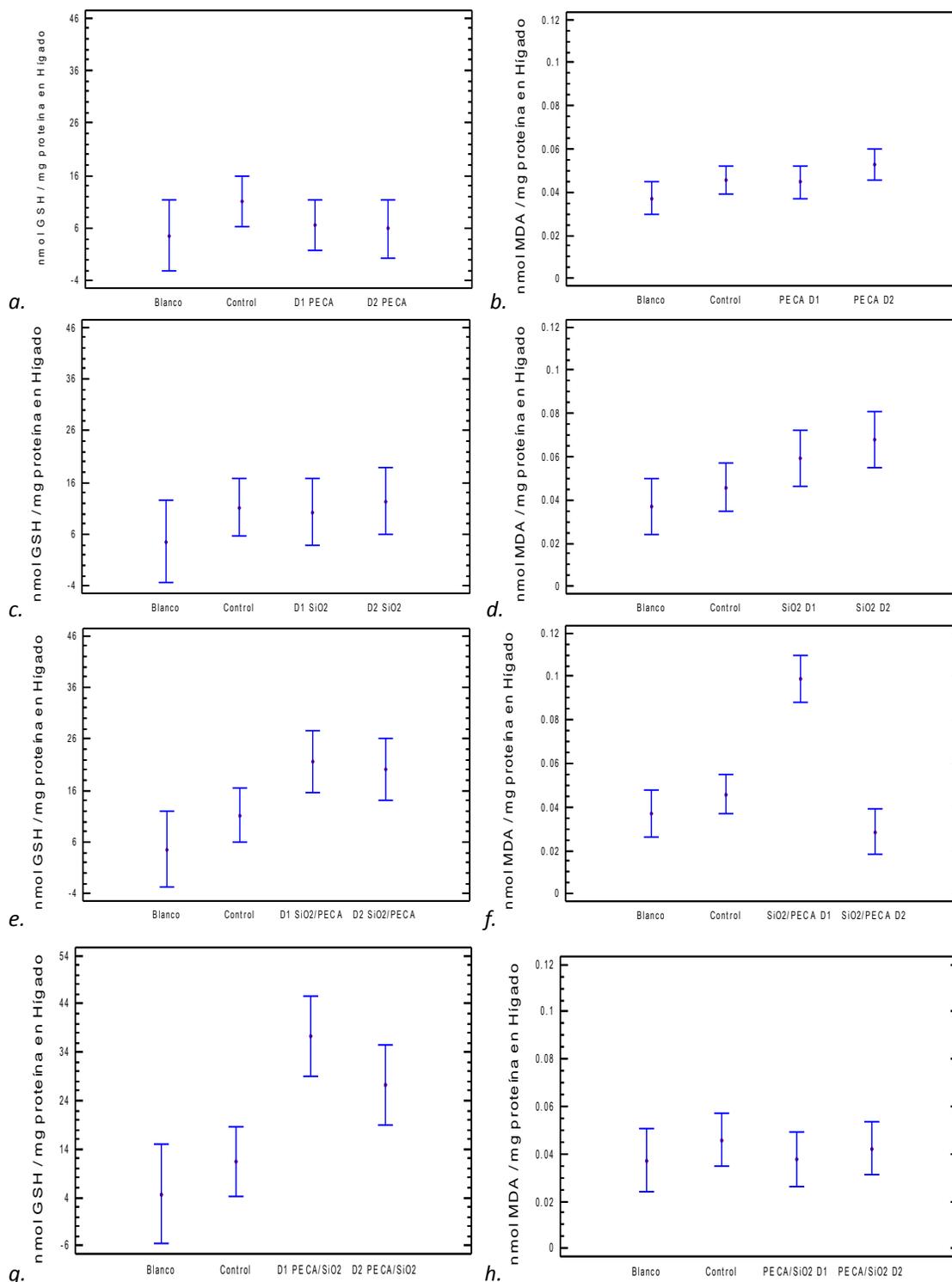


Fig. 53 "Resultados del Análisis de Varianza por Tukey HSD de las pruebas de citotoxicidad para determinar el Efecto de la Dosis por cada sistema nanoparticulado: PECA (a. y b.), SiO₂ (c. y d.), SiO₂/PECA (e. y f.) y PECA/SiO₂ (g. y h.) en las concentraciones de MDA y GSH en Hígado"

Nanotoxicología

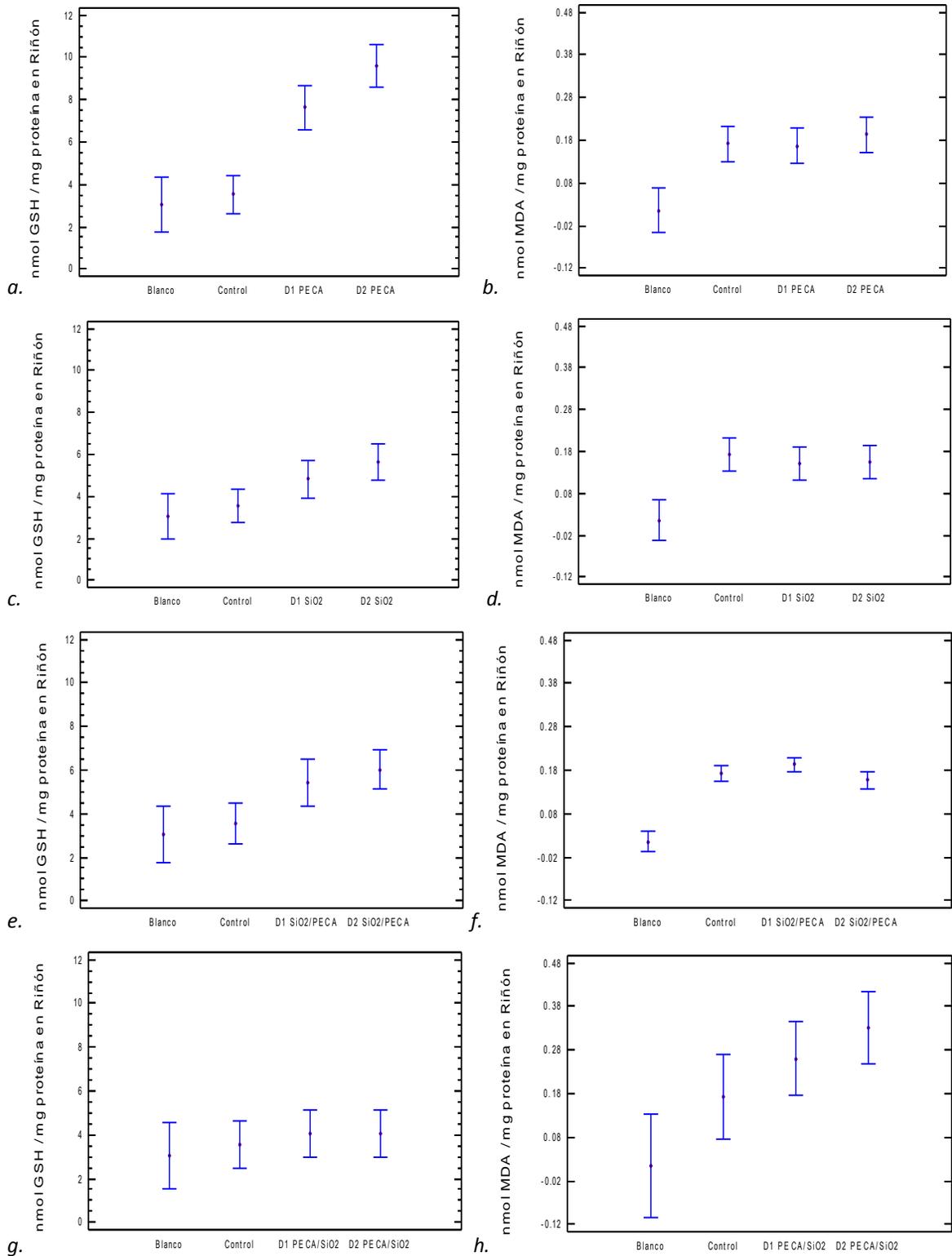


Fig. 54 "Resultados del Análisis de Varianza por Tukey HSD de las pruebas de citotoxicidad para determinar el Efecto de la Dosis por cada sistema nanoparticulado: PECA (a. y b.), SiO₂ (c. y d.), SiO₂/PECA (e. y f.) y PECA/SiO₂ (g. y h.) en las concentraciones de MDA y GSH en Riñón"