



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Campo-1

**“ESTUDIO DE LOS EFECTOS ÓXIDO-REDUCTORES INDUCIDOS EN EL
TESTÍCULO Y PULMÓN DE RATAS EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE
PECA Y SiO_2 ”**

TESIS

Para obtener el grado de Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

PRESENTA

Israel Silverio García

ASESORES

Dra. Patricia Ramírez Noguera

Dr. Roberto Díaz Torres

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos

Principalmente me gustaría agradecer a mis asesores la Dra. Patricia Ramírez Noguera y el Dr. Roberto Díaz Torres, ya que sin su ayuda y su paciencia este trabajo no habría sido posible.

También me gustaría agradecer a mi familia por el apoyo que me ha brindado; a todos mis amigos que han estado conmigo a lo largo de estos años y me han ayudado a ver de una manera diferente el mundo como son Juan, Alejandro, Joseph, Marcos, Ariel y Lalo, gracias por todas las risas y los buenos momentos que pasamos juntos y por enseñarme que el tiempo no deforma a un espíritu libre. A mi muy querida amiga Estefanía por mostrarme el valor de la perseverancia y la tenacidad. A Carolina por las largas platicas. A Ana Julieta por enseñarme que en las mentes creativas no existe el tiempo. A Erika por su amistad y su apoyo. Gracias a todos ustedes por darle más color a mi vida ya que los considero de mi familia, y especialmente a Roberto, Jesús y Daniel por acompañarme y apoyarme en esta divertida travesía, por haber ido creciendo juntos, por toda la ayuda y las enseñanzas; muchas gracias. También quisiera agradecer a Dulce, Mara, Toby, Ana Lilia, Juan Antonio, al chino, al cañas, al negro y a todos los rostros invisibles que de algún modo me han ido enseñando nuevas maneras de apreciar la naturaleza, a todos mis amigos que ya no están; para ellos también muchas gracias.

ÍNDICE

• Resumen.....	5
I. Abreviaturas.....	6
II. Introducción.....	8
III. Nanopartículas de polietilcianoacrilato y dióxido de silicio (PECA y SiO ₂).....	14
• Propiedades de las nanopartículas en estudio.....	14
• Usos de las nanopartículas.....	18
• Efectos biológicos asociados a polietilcianoacrilato y dióxido de silicio (PECA y SiO ₂).....	21
• Toxicidad y Genotoxicidad en órganos asociada a la exposición de PECA y SiO ₂	24
• Órganos blancos para NP de PECA y SiO ₂	28
• Métodos para la estimación de la citotoxicidad y genotoxicidad <i>in vivo</i>	32
IV. Estrés oxidativo.....	38
• ¿Qué es?.....	38
• ¿Porque es importante su estudio?.....	41
• Glutación (GSH) como antioxidante.....	42
• Importancia de GSH.....	42
• Metabolismo del glutación.....	44
• Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico TBARS (Lipoperoxidación).....	46

V.	Planteamiento del problema	47
VI.	Objetivo general	48
VII.	Objetivos específicos	48
VIII.	Hipótesis	48
IX.	Estrategia experimental	49
X.	Discusión	52
XI.	Conclusiones	61
XII.	Perspectivas del estudio	62
XIII.	Anexo	63
XIV.	Referencias	69

Resumen

En el presente trabajo se pretenden dar a conocer los resultados relacionados con el efecto oxido-reductor en testículo y pulmón de ratas expuestas a nanopartículas de SiO₂ y PECA, así como de sistemas de nanopartículas híbridas.

Para comenzar diremos que las nanopartículas se pueden definir como sistemas sólidos, de tamaño submicrométrico (1-1000 nm); experimentalmente se sintetizaron nanopartículas de SiO₂ y PECA, aunque también se sintetizaron nanopartículas híbridas de SiO₂/PECA y PECA/SiO₂. Estos sistemas fueron administrados a ratas macho de la cepa Wistar en un periodo de una semana, posteriormente fueron sacrificadas y se extrajeron sus órganos, posteriormente fueron congelados.

El objetivo de realizar este estudio tiene como fundamento evaluar los efectos citotóxicos producidos por la exposición a nanopartículas ya que en la actualidad el uso de las nanopartículas está teniendo un auge debido a sus amplias aplicaciones en los campos de la biomedicina, farmacología, como aditivo para pinturas; entre otras. Es por ello que resulta relevante conocer los efectos relacionados con la exposición a dichos agentes.

Los parámetros estudiados para conocer el efecto oxido-reductor fue la determinación de TBARS y GSH, donde se encontró que las nanopartículas de SiO₂ tienen un mayor efecto en testículo mientras que las nanopartículas de PECA tienen un mayor efecto en pulmón. Otro de los efectos encontrados tienen que ver con el medio donde se encuentran suspendidas las nanopartículas, ya que este ejerce un efecto por sí mismo en las células de los tejidos. En términos generales no se puede decir que exista un fenómeno dosis respuesta, ya que no hay congruencia al administrar dosis bajas y dosis altas de nanopartículas.

I. Abreviaturas

NP Nanopartículas

PECA Polietilcianoacrilato

PACA Poliaquilcianoacrilato

NLS Nanopartículas Lipídicas Sólidas

ADN Ácido Desoxirribonucleico

ERO Especies Reactivas De Oxígeno

MET Microscopía Electrónica De Transmisión

MEB Microscopía Electrónica De Barrido

JGA Jugo Gástrico Artificial

FIS Fluidos Intestinales Simulados

NM Nanomateriales

PBCA Polibutilcianoacrilato

TNF Factor de Necrosis Tumoral

PAL Polímeros de Ácido Láctico

PAG Polímeros de Ácido Glicólico

MDA Malondialdehído

TBARS Especies Reactivas de ácido Tiobarbitúrico

GSH-Rd Glutati3n Reductasa

ASH Albúmina De Suero Humano

Eox Estrés Oxidativo

ER Especies Reactivas

RL Radicales Libres

II. Introducción

Las Nanopartículas (NP) se pueden definir como sistemas sólidos, de tamaño submicrométrico (1-1000 nm); son capaces de exhibir una gama de propiedades ideales tales como resistencia a la compresión, superficies activas (que tienen importantes propiedades catalíticas) entre otros. Debido a que las nanopartículas contienen 10^6 átomos o menos, sus propiedades difieren de aquellas que tienen los mismos átomos enlazados entre sí pero para formar materiales voluminosos (Wiley, 2003). Además, las posibles aplicaciones de NP incluyen almacenamiento de datos ópticos, sensores, y la conversión de energía solar. Si bien las composiciones químicas de las NP son importantes, la morfología de las NP (tamaño, forma) y su superficie, así como sus propiedades coloidales, son igualmente esenciales. Por ejemplo, se sabe que las NP pequeñas tienen mayor actividad antimicrobiana que las NP grandes (Irache, 2011).

El término nanopartícula engloba las nanoesferas y nanocápsulas, con estructuras análogas como las micropartículas. La principal ventaja de las NP con respecto a las anteriores radica en que poseen la capacidad de atravesar membranas biológicas (Hernández, 2010).

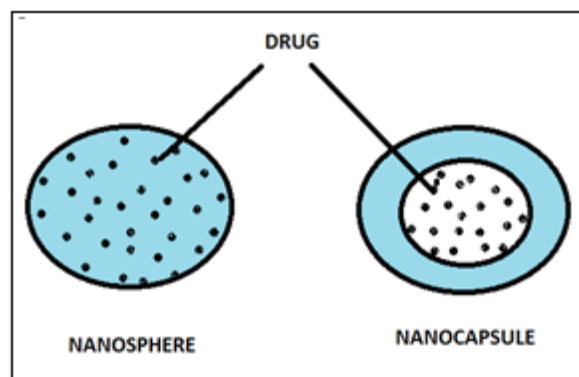


Imagen 1. Diferencias entre nanoesfera y nanocápsula (Nagavarma, 2012).

Las Nanoesferas son partículas de matriz, es decir, partículas cuya masa de la superficie es sólida y las moléculas pueden estar adsorbidas en la superficie de la esfera o encapsuladas. En general, son esféricas, pero también se describen "nanoesferas" con una forma no esférica. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares, que actúan como una especie de depósito, en el que las sustancias atrapadas se limitan a una cavidad que consta de un núcleo líquido (aceite o agua) rodeado por una capa de materia sólida.



Imagen 2. A) Nanoesferas, B) Nanocápsulas de aceite, C) Nanocápsulas de agua (Prasad, 2011).

El interés en las NP es producto de sus bien definidas dimensiones y propiedades funcionales; sin embargo se ha visto obstaculizada por falta de un control riguroso en los parámetros experimentales en la síntesis de estas. Los esfuerzos más recientes se realizan para desarrollar métodos simples y reproducibles que sean capaces de generar muestras monodispersas en pequeñas y grandes cantidades (Passagne, 2012).

El tamaño y forma de las NP desempeña un papel muy importante en su utilidad comercial. Por ejemplo, los filtros ópticos selectivos y biosensores se encuentran entre las muchas aplicaciones que utilizan las propiedades ópticas de las NP de oro. Estas propiedades ópticas están relacionadas con la superficie de resonancia de los plasmones que dependen fuertemente de la forma de la partícula; formas más grandes producen mayores pérdidas de plasmones (Berkosvskaya,1997). En aplicaciones médicas, la morfología de las NP dicta sus

funciones, incluyendo la internalización celular, biodistribución y la captación tisular por medio del suministro *in vivo* (Jong, 2008).

Otro aspecto extremadamente importante de las NP además de su morfología, es su composición; ya que pueden ser formadas a partir de una amplia variedad de elementos. El uso de iones metálicos durante el proceso de formación de las NP tiene como resultado propiedades más beneficiosas que son cada vez más comunes en las nuevas tecnologías y procesos. Por ejemplo, una revisión reciente sobre las nanopartículas de plata (Sweet, 2011) aborda el uso de NP de Ag en una amplia gama de aplicaciones incluyendo, el almacenamiento de alimentos, la fotónica, almacenamiento de información, sistemas de detección electrónicos y ópticos, agentes terapéuticos, diagnósticos, la energía fotovoltaica y catalizadores. Sin embargo, a pesar de las importantes ventajas del uso de las NP de Ag; éstas se encuentran formadas con metales como la plata y el desafío de controlar la forma sintética de metal ha tenido un éxito variable. En la escala nanométrica, los metales como Ag, producen de manera natural Formas Cúbicas con Caras Centradas o FCCS y tienden a precipitar partículas hermanadas, estas partículas hermanadas se multiplican con superficies delimitadas por las facetas de energía más bajas, haciendo la manipulación dirigida a un cierto tamaño y / o forma de las NPs metálicas más difícil.

Algunas de las ventajas que ofrecen las NP poliméricas son el aumento la estabilidad de los agentes farmacéuticos volátiles, ofrecen una mejora significativa sobre los métodos tradicionales de administración como son la vía oral e intravenosa; esto en términos de eficiencia y eficacia (Abhilash, 2010). Proporciona una mayor concentración de agente farmacéutico a un lugar deseado, la elección del polímero y la capacidad de modificar la liberación del fármaco a partir de NP poliméricas las han hecho candidatas ideales para la terapia del cáncer, anticonceptivos y de entrega de antibióticos específicos (Kayser, 2005).

Las nanopartículas se clasifican como nanocristales, nanopartículas poliméricas, liposomas y nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), esto en función de su composición, la función y la morfología. Las formas más comunes de NP son las

estructuras cúbicas y estructuras icosaédricas; para su elaboración los polímeros deben ser biocompatibles con el cuerpo en los términos de la capacidad de adaptación (Baja toxicidad y baja antigenicidad), además deben ser biodegradables (Ghosh, 2000).

Los polímeros más comúnmente utilizados para la síntesis de NP se dividen en dos grandes grupos; los naturales y los sintéticos. Entre los polímeros naturales se encuentran (Fernandez, 1999 y Aynie, 1998):

- Quitosan
- Gelatina
- Alginato de sodio
- Albúmina

Y dentro de los polímeros sintéticos tenemos (Shorki,2011; Ghosh, 2000 y Babak, 2011):

- Poliláctidos (PLA)
- Poliglicólidos (PGA)
- Polianhídridos
- Polioctoésteres
- Policianoacrilatos
- Policaprolactona
- Poli Ácido glutámico
- Poli Ácido málico
- Poli (N-vinil-pirrolidona)
- Poli (metacrilato de metilo)
- Poli (alcohol vinílico)
- Poli (ácido acrílico)
- Poli (etilenglicol)

Como se mencionó anteriormente, las NP pueden ser producidas en una gran variedad de formas, tamaños y composición. En la actualidad, la síntesis de nanopartículas se ve favorecida con diferentes métodos disponibles. Sin embargo, estos métodos tienen muchas limitaciones con respecto al control que se tiene sobre el tamaño y forma. Además, estos métodos utilizan productos químicos tóxicos durante la fabricación y tienen necesidades intensivas en gasto de energía, que los hacen costosos (Pasard, 2011).

En principio, hay dos estrategias diferentes para la síntesis de nanopartículas que se producen dentro de los laboratorios. El método conocido como “de arriba hacia abajo”; comienza a partir de material a granel que se descompone por influencias mecánicas en fragmentos cada vez más pequeño hasta llegar a tamaños submicrométricos. Los objetos resultantes tienen un diámetro medio de aproximadamente 100 nm y muestran una distribución de tamaño muy amplio. Por lo tanto, este enfoque no es generalmente adecuado para la fabricación de partículas con una configuración geométrica bien definida. El método de abajo hacia arriba se puede entender como una aproximación desde la dirección opuesta: Un precursor pequeño, comúnmente un compuesto organometálico o una sal, se descompone por los siguientes métodos: 1) la descomposición térmica y 2) excitación óptica. A través de estos métodos se obtienen partículas con un diámetro de 1-50 nm y una distribución de tamaño estrecha (Pasard, 2011).

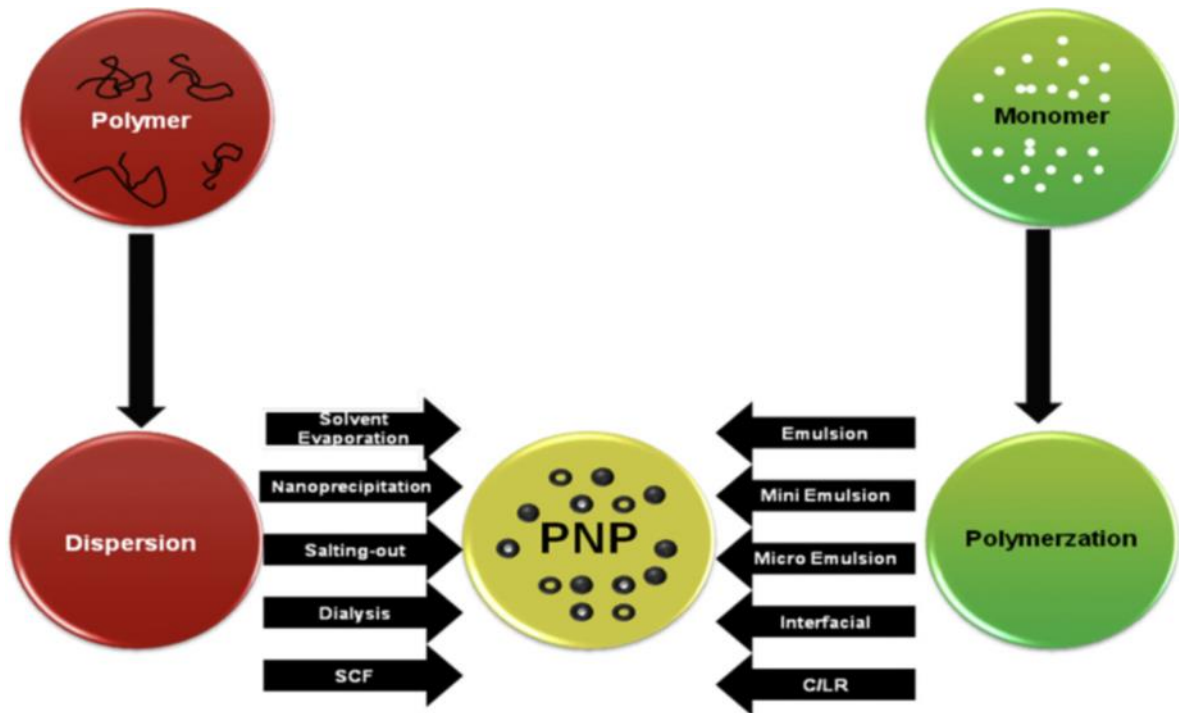


Imagen 3. Representación esquemática de las diversas técnicas para la preparación de nanopartículas de polímeros (Prasad, 2011).

Las propiedades de las NP tienen que ser optimizadas dependiendo de la aplicación particular. Con el fin de conseguir las propiedades de interés, es muy ventajoso tener técnicas de síntesis para obtener las NP con una aplicación particular. Los métodos para la preparación de NP a partir de la dispersión de polímero preformado son los siguientes (Pasard, 2011):

- a) Evaporación del disolvente
- b) Nanoprecipitación
- c) Emulsificación
- e) Diálisis
- f) Tecnología de Fluidos Supercríticos (SCF)

Los siguientes son métodos para la preparación de NP a partir de la polimerización de monómeros (Pasard, 2011):

- a) Emulsión
- b) Mini emulsión
- c) Micro emulsión
- d) Polimerización interfacial
- e) Polimerización Radical Controlada (C / PRL)

III. Nanopartículas PECA y SiO₂

- *Propiedades de las nanopartículas en estudio*

SiO₂

En las últimas décadas, las NP de SiO₂ se han estudiado intensamente en diversos experimentos y simulaciones por ordenador debido a sus importantes aplicaciones en tecnologías de materiales, tales como la electrónica y la óptica de nanodispositivos.

Sílice, es el nombre común para materiales compuestos de dióxido de silicio (SiO₂) y existe en formas cristalinas y amorfas. La sílice cristalina existe en múltiples formas. Una de ellas es el cuarzo, un material conocido que tras su calentamiento, este se transforma en b-cuarzo, tridimita y cristobalita. El POROSIL es el nombre de la familia de la sílice cristalina porosa. El cuarzo existe en formas naturales y

sintéticas, mientras que todos los POROSIL son sintéticos. La aplicación de la sílice amorfa sintética, especialmente las NP de sílice, ha recibido amplia atención en una variedad de industrias. Las NP de sílice se producen a escala industrial como aditivos para cosméticos, fármacos, toners de impresora, barnices, y alimentos. Además, las NP de sílice están siendo utilizadas para una amplia variedad de aplicaciones biomédicas y biotecnológicas, tales como la terapia del cáncer, la transfección de ADN, la administración de fármacos, y la inmovilización de enzimas (Ravi, 2004). Hasta hace poco, la mayoría de la investigación se había centrado en partículas de sílice de entre 0,5 y 10 micras, principalmente en formas cristalinas, pero las NP de sílice pueden tener diferentes efectos tóxicos en comparación con las partículas más grandes. Las propiedades fisicoquímicas de las NP de sílice que los hacen atractivos para la industria pueden presentar peligros potenciales para la salud humana, incluyendo una mayor capacidad para penetrar objetivos intracelulares en el pulmón y la circulación sistémica (Dorota, 2010 y Barik 2008).

Se encontró que las NP de sílice tienen una serie de propiedades novedosas, tales como, soporte de catalizador, fotoluminiscencia, luminiscencia, bajo coeficiente de expansión térmica, conductividad térmica baja, alta temperatura de ablandamiento, inercia química excelente, y la constante dieléctrica baja (C. Jia, 2003). Por lo tanto, la comprensión de la relación entre la estructura de NP de SiO_2 y sus propiedades fisicoquímicas es muy necesario (Legrand, 2003).

El SiO_2 y algunos otros polímeros han demostrado tener una distribución estrecha de tamaño necesaria para la formación de coloides de alta calidad. Existen diversos métodos para la producción de nanopartículas de SiO_2 ; Kolbe fue el primero en encontrar un método para la formación de partículas esféricas de SiO_2 a través de la hidrólisis y condensación de tetraetil ortosilicato (TEOS) en una solución de agua/alcohol y utilizando hidróxido de amonio como sistema catalizador (Kolbe, 1956). Stöber, años más tarde preparó partículas de sílice, que es considerado un método más simple y consiste en la adición de concentraciones crecientes controladas, este método consiste en utilizar al TEOS como precursor del SiO_2 , al hidróxido de amonio como catalizador de la reacción de hidrólisis y en

función como solventes se utiliza el metanol, etanol y butanol; esto debe estar bajo agitación rigurosa a temperatura ambiente y atmósfera de nitrógeno, en donde se utilizan diferentes grupos de muestras que tienen diferentes concentraciones de NH_4OH (Kolbe, 1956). La longitud de las nanopartículas preparadas por este método varía en función de la concentración de NH_4OH y puede ir desde los 22 a los 320 nm.

Las aplicaciones de las NP de sílice han tenido gran difusión, sin embargo, aumenta la preocupación con respecto a la exposición al medio ambiente y al humano; por lo tanto el riesgo potencial relacionado con su toxicidad a corto y largo plazo. Hay estudios que informaron la toxicidad de las NP de sílice para las bacterias (*Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*), algas verdes (*Pseudokirchneriella subcapitata*) y pez cebra (*Danio rerio*), en este la toxicidad fue evaluada por la mortalidad, el tiempo de incubación y por alteraciones morfológicas. No se observó absorción de NP y translocación en embriones, tampoco se pudo detectar la absorción de nanopartículas por microscopía confocal aunque pudo haber ocurrido. El tiempo de eclosión y éxito de eclosión no se vieron afectados. No hubo mortalidad ni ocurrieron deformidades. (Adams, 2006 y Nel, 2006). Las NP de sílice puede entrar en el cuerpo humano a través de diferentes vías como la inhalación, ingestión, contacto con la piel y la inyección, esta última en ratones se puede distribuir en casi todos los órganos y se acumulan principalmente en los pulmones, el hígado y el bazo, donde pueden retenerse y producir efectos tóxicos (Liu, 2011). Los investigadores también observaron que el hígado es uno de los órganos diana para la mayoría de las NP de sílice (Lu, 2011). Aunque existen estudios para evaluar la toxicidad de las NP de sílice en cultivos de células de hígado humano; los posibles mecanismos de toxicidad hepática debido a la exposición a estas todavía no están claros.

Un mecanismo que se discute a menudo es la inducción de daño oxidativo de los constituyentes celulares debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Nel, 2006). Los estudios han demostrado que las NP tienen el potencial de inducir daño de ADN mediada por ERO y apoptosis (Ahamed, 2011 y Ahamed, 2008).

Polietilcianoacrilato (PECA)

Los Alquil-2-Cianoacrilatos (ACA) se sintetizaron por primera vez en 1949 (Ardis, 1949) y se han conocido como uno de los monómeros más reactivos. Aunque estos monómeros pueden sufrir una polimerización a través de dos mecanismos; polimerización de radicales libres y aniónicos, la vía aniónica ha atraído más interés debido a la facilidad de iniciación y rápida velocidad de polimerización, incluso por trazas de nucleófilos o bien, por bases débiles tales como agua, aminas, alcoholes o fosfinas. La eficacia de la polimerización aniónica de las ACA se origina a partir de la propiedad de monómero di sustituido y los grupos aceptores de electrones fuertes como el nitrilo (CN) y éster (COOR).

Los polialquilcianoacrilatos (PACA) han sido ampliamente propuestos como materiales prometedores en la fabricación de NP para la liberación de fármacos debido a su capacidad para atrapar una variedad de compuestos biológicamente activos (fármacos), seguido por la administración *in vivo* y la liberación a través de biodegradación (Vauthier, 2003). Otras aplicaciones de estos polímeros incluyen la detección de huellas dactilares latentes en las investigaciones del crimen (Exline, 2003), así como otras aplicaciones médicas. Estos polímeros tienen una estabilidad débil y se degradan fácilmente en contacto con el agua y a temperaturas elevadas. Por lo tanto, la escasa estabilidad de estos polímeros a temperaturas elevadas generalmente limita sus aplicaciones como adhesivos y materiales compuestos de polímeros debido a sus temperaturas de funcionamiento limitado.

Los PACA son unos polímeros biodegradables muy adecuados para uso farmacéutico y usualmente son elegidos para ser portadores de drogas. PECA es un miembro de la familia de PACA, al que se le tiene gran interés debido a su fuerte reactividad con sus los monómeros correspondientes, capaces de polimerizarse fácilmente en diversos medios, entre ellos, el agua (Domb, 1997).

Para el desarrollo de PECA existen también diversos métodos de elaboración aunque con ligeras variaciones en su producción; la mayoría de modelos

experimentales se basan en el método de emulsión/polimerización para la síntesis de esferas coloidales, en el cual el mecanismo de polimerización es un proceso aniónico iniciado por bases covalentes presentes en el medio (por ejemplo, iones OH^- derivados de disociación del agua) e incluso de bases débiles que son capaces de ionizar el monómero dando lugar a carbaniones que a su vez reaccionan con otras unidades de monómeros para formar enlaces “cadenas”. La polimerización termina mediante la adición de cationes que neutralizan tales cadenas. La técnica implica la polimerización del monómero en una solución acuosa (de un fármaco en la mayoría de los casos) (Fattal, 1997).

- *Usos de las nanopartículas*

SiO₂

Existe un interés creciente en el desarrollo de nanocompuestos que consisten en polímeros orgánicos y nanopartículas de SiO₂. Las nanopartículas de sílice (SiO₂) son uno de los nanomateriales más utilizados en la fabricación industrial, ingeniería y medicina. La inhalación de nanopartículas de SiO₂ ha demostrado producir daño pulmonar, también puede ser transportado en la sangre y se depositarse en órganos diana donde ejercen efectos tóxicos potenciales. El sistema renal se considera como tal un blanco secundario (Passagne, 2012).

En otros ensayos realizados se menciona la síntesis de NP de Ag y Ag-SiO₂ por irradiación que se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (MET), microscopía electrónica de barrido (MEB), y espectroscopía de rayos X. Aquí las imágenes de microscopía electrónica muestran que las nanopartículas de Ag están dispersas en un rango de aproximadamente 7 nm y se unen a la superficie de nanopartículas de SiO₂ de alrededor de 350 nm. La eficacia antibacteriana de estas NP de Ag-SiO₂ fue probado contra *Salmonella enterica serovar Typhimurium*

mediante la medición de la densidad óptica (OD). Sin NP de Ag-SiO₂, la *S. enterica* serovar *Typhimurium* crecer lentamente, y llega a un estado de equilibrio (crece completamente) en aproximadamente 6 horas. En la presencia de NP de Ag-SiO₂ a 50 ppm, su crecimiento se hizo mucho más lenta, alcanzando un estado de equilibrio después de aproximadamente 24 h. Con NP de Ag-SiO₂ a 100 ppm, no crecieron incluso después de 58 h. La eficacia antifúngica de las NP de Ag-SiO₂ contra *Botrytis cinerea* era aproximadamente 65.0, 99.9, y 99.9% en las concentraciones de las partículas de 10, 50 y 100 ppm, respectivamente (Seong-Dae Oh, 2006).

También son ampliamente utilizados en el campo biomédico, por ejemplo, como biosensores para el ensayo simultáneo de la glucosa (Zhang, 2004), la administración de fármacos, la terapia del cáncer, y la inactivación de las enzimas, así mismo es importante evaluar los posibles efectos tóxicos y no intencionales, funcional o de señalización que puede inducir, como consecuencia de su internalización celular (Kaewamatawong, 2005).

PECA

El uso de los PACA se ha utilizado desde la década de 1940 como una nueva metodología en el tratamiento de aguas residuales, pero no fueron empleados como polímeros hasta principios de 1980. Sin embargo, los monómeros correspondientes, se han utilizado al menos desde 1966, debido a sus excelentes propiedades adhesivas. Por lo tanto, dichos monómeros cumplen amplias funciones como adhesivos de tejidos para el cierre de heridas en la piel, como pegamento quirúrgico, y como material para la cirugía endovascular (Oowaki, 2000).

Se ha despertado interés en la posibilidad de obtención de partículas magnéticas adecuadas para el suministro de fármacos en algunos lugares específicos en el cuerpo (Williams, 1994). Su objetivo principal es crear partículas capaces de llevar la cantidad deseada de medicamento para el objetivo deseado y

liberarlo a una velocidad controlada. Las partículas magnéticas coloidales en principio, podrían ser un vehículo fármaco adecuado, debido a su capacidad de respuesta externa de campo; es decir, al aplicar un campo magnético se conduciría a la partícula a un lugar deseado en el organismo, siendo este cualquier órgano y mantenerlo allí durante un período determinado de tiempo; esto conduciría a un mayor lapso de retención dado que el tiempo de reconocimiento y eliminación por el sistema fagocítico mononuclear puede llevar más tiempo.

Las partículas magnéticas por sí solas, sin embargo, no son las más adecuadas como vehículos de fármacos debido a que no se puede controlar la cantidad de fármaco que transporta y la velocidad a la que se puede liberar. A diferencia de las partículas magnéticas, los polímeros biodegradables (como PECA) pueden liberar fármacos (Mckay, 1994).

Existen estudios realizados de NP de PACA que contienen el esterilizante químico D-Lys6-GnRH donde se analiza su potencial como sistema para el control biológico de la *Zarigüeya brushtail*, una de las plagas más importantes de Nueva Zelanda. Las NP se prepararon por una técnica de polimerización interfacial *in situ*. La liberación del péptido contenido en las NP resultantes se estudió *in vitro* en jugo gástrico artificial (JGA), fluidos intestinales simulados (FIS) y plasma de la *Zarigüeya brushtail* que fue administrada en el ciego por una incisión en el estómago. Las NP liberan una pequeña fracción de bioactivo durante 6 h en JGA y FIS (<5%). En contraste, 60% de D-Lys6-GnRH fue liberado después de 1 h en plasma zarigüeya. Una respuesta biológica significativa observada fue medida como un aumento en el plasma de la hormona luteinizante (LH), que se hizo evidente a 10 min después de la administración. Esto demuestra que las NP PECA fueron capaces de facilitar la captación de D-Lys6-GnRH, por lo anterior, se puede decir que las NP de PECA comprenden una estrategia prometedora para la aplicación de D-Lys6-GnRH como esterilizante a la *Zarigüeya brushtail* en Nueva Zelanda (Kafka, 2011).

Se han producido resultados muy prometedores como sustratos poliméricos en la realización de un sistema de nanopartículas inyectables, debido a sus propiedades mecánicas, de biodegradabilidad y biocompatibilidad. La

biocompatibilidad de estos vectores con las drogas puede estimar la alta permeabilidad con las membranas (Cavallaro, 1994). Dado que esta familia de compuestos ha sido utilizada para realizar una amplia gama de medicamentos, una de las aplicaciones terapéuticas más prometedoras de la familia PACA de NP es el tratamiento del cáncer, en el que su eficacia terapéutica se ha asociado a la capacidad observada *in vitro* de invertir la resistencia a los fármacos anticancerosos en células tumorales (Decout, 1996).

- *Efectos biológicos asociados a polietilcianoacrilato y dióxido de silicio PECA y SiO₂*

SiO₂

Los nanomateriales (NM) como SiO₂ están encontrando cada vez más aplicaciones en los campos de la biomedicina y la biotecnología, tales como el diagnóstico de enfermedades, imágenes, administración de fármacos, alimentos, cosméticos y el desarrollo de biosensores. Por lo tanto, una evaluación mecánica y sistemática de los posibles efectos biológicos y tóxicos de SiO₂ NP se ha vuelto crucial a fin de determinar sus límites de aplicabilidad. En ratones las interacciones de las NP de sílice con diferentes tipos de células han sido investigadas en diversos tejidos, en particular en las células de las vías respiratorias y las células del sistema inmune. La inducción de estrés oxidativo, daño de la membrana y perturbaciones en la homeostasis del calcio se encontraron como mecanismos subyacentes de la toxicidad celular.

Por lo general, las NP pequeñas parecen inducir efectos más considerables que los más grandes (100-1000 nm), por ejemplo, las NP formaron aglomerados / agregados en medios de cultivo celular tal como se revela por MEB y MET y también se producen en estructuras vesiculares en el citosol. Además inducen necrosis de

los hepatocitos, aumento de las aminotransferasas séricas y de citocinas en los ratones expuestos (Verena, 2012).

Existe un estudio en donde se evaluó la toxicidad de NP de SiO₂ usando como modelo de estudio a *Saccharomyces cerevisiae*, se utilizó un dispersante de poliacrilato no tóxico (Dispex A40) para mejorar la estabilidad de las NP y determinar el impacto de la dispersión mejorada en la toxicidad. La toxicidad fue evaluada mediante el seguimiento del consumo de oxígeno en cultivos discontinuos y por análisis de la integridad de la membrana celular. Se observó también que las NP de SiO₂ y causó daño de la membrana celular, pero en general se demuestra que estos nanomateriales muestran una baja o nula toxicidad en la levadura (García, 2011).

En otro estudio se menciona que las NP de SiO₂ de 20 nm son más tóxicas que las de 100 nm; con una importante disminución de la viabilidad celular observada sólo a altas concentraciones (concentraciones entre 0,0025 y 200 mg / L). De acuerdo al estudio, la producción de ERO no se modificó significativamente después de la exposición a bajas concentraciones. La expresión de la catalasa fue 3 veces mayor después de la exposición a las NP, lo que sugiere una adaptación celular (Rousset, 2011).

También se han diseñado experimentos para examinar la captación, localización y los efectos citotóxicos de NP de sílice amorfo en los queratinocitos de ratón (HEL-30). Los queratinocitos de ratón fueron expuestos durante 24 h a diversas concentraciones de NP (0, 10, 50, 100, and 200 µg/mL) de sílice en suspensiones homogéneas de distribución de tamaño medio (30, 48, 118, y 535 nm), después se realizaron algunas determinaciones; como son la evaluación de LDH para estimar la integridad de la membrana; el ensayo MTT para evaluar la actividad mitocondrial, donde el amarillo MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) se reduce a formazán púrpura (insoluble en solución acuosa) por una enzima mitocondrial que muestra las mitocondrias funcionales intactas; y la determinación de GSH por un método fluorométrico. Los resultados de microscopía electrónica de transmisión revelaron que todos los tamaños de NP administrados

se encontraban localizados en el citoplasma. La lactato deshidrogenasa (LDH) muestra pérdida a nivel citoplasmático y efecto dosis-dependiente con respecto al tamaño y exposición en NP de 30 y 48 nm. Sin embargo, no se observó pérdida de LDH, ya sea para 118 o 535 nm NP. El ensayo de viabilidad mitocondrial (MTT) mostró una toxicidad significativa para NP de 30 y 48 nm a concentraciones altas (100 mg / ml) en comparación con las NP de 118 y 535 nm. El potencial redox de las células se redujo significativamente a exposiciones de nanopartículas a concentraciones de 50, 100, y 200 mg/mL. Sin embargo, las NP de sílice más grandes que 30 nm no mostraron cambios en los niveles de GSH. Las ERO no mostraron ningún cambio significativo entre los controles y las células expuestas (Kyung, 2009).

Se ha informado que *in vivo*, en un modelo de ratón, las partículas ultrafinas de sílice coloidal (diámetro <100 nm) inducen una lesión pulmonar (Kaewamatawong, 2005) e inflamación, que se manifiestan como la acumulación de neutrófilos en la etapa temprana de la exposición (24 h) y granulomatosa crónica de inflamación en las etapas posteriores (14 semanas). Además, varios estudios han proporcionado pruebas de que el SiO₂ puede provocar aglomeraciones anormales de la topoisomerasa I en el nucleoplasma de las células, y estimulación proinflamatoria tanto en modelos *in vivo* como en modelos *in vitro* (Chen, 2004).

PECA

La degradación y toxicidad de los PACA se discuten a menudo en la literatura, especialmente para aplicaciones *in vivo* de NP de PACA como sistemas de suministro de fármacos. La idoneidad de un polímero diseñado para su uso como un sistema de soporte de algún fármaco para los seres humanos requiere que el material deba ser biocompatible y biodegradable o al menos debe ser capaz de ser excretado (por ejemplo, por los riñones). Se han descrito diferentes rutas para la degradación de PACA; aunque el mecanismo predominante depende en gran

medida de las condiciones del entorno. Uno de los mecanismos de degradación reportados en la literatura consiste en la hidrólisis del enlace éster de la cadena lateral alquilo del polímero. Estudios demuestran que en algunos casos, la alteración del perfil de distribución de drogas por la vinculación con nanoesferas puede reducir considerablemente la toxicidad de un fármaco debido a la disminución de la acumulación del fármaco en órganos en los que los efectos tóxicos son más agudos. Este concepto se ilustra con la doxorubicina, que muestra miocardiopatía grave, aguda y crónica. Después de la administración intravenosa a ratones, los niveles en plasma de doxorubicina fue mayor cuando el fármaco se absorbe como nanoesferas. De acuerdo con el perfil de distribución observada, se encontró que la doxorubicina asociada con nanoesferas era menos tóxica que la doxorubicina libre (Verdiere, 1997).

Estudios que se evocan a tratamientos contra el cáncer basados en el uso de nanopartículas de curcumina cubierta de polibutilcianoacrilato (PBCA) demuestran que el tratamiento con estas tiene como resultado el retraso del crecimiento significativo de células HepG2 de humano (Jinghua, 2010). Debido a que los polialquilcianoacrilatos (PACA) son biocompatibles y biodegradables, el polibutilcianoacrilato ha recibido la aprobación de la FDA para uso humano. Los productos de degradación consisten en un grupo alquílico y un polímero de ácido cianoacrílico, que son solubles en agua y suelen ser eliminados *in vivo* por medio de filtración renal (Zheng 2004).

- *Toxicidad y Genotoxicidad en órganos asociada a la exposición de PECA y SiO₂.*

SiO₂

Aunque se cree que las NP de sílice amorfa no son tóxicas y se utilizan actualmente en varias aplicaciones industriales y biomédicas, incluidos los cosméticos, aditivos alimentarios y sistemas de suministro de fármacos, todavía no hay información contundente sobre su potencial citotóxico, genotóxico y carcinogénico. Algunos efectos citotóxicos de las NP de sílice son; la reducción de la viabilidad celular, daño del sistema de membrana celular y estrés oxidativo (Choi, 2010). Es ampliamente discutido que las ERO producidas por el estrés oxidativo es un efecto clave en la toxicidad de los nanomateriales (Meng, 2009), se confirma entonces que las NP de sílice pueden generar estrés oxidativo, posteriormente promover la señalización de la apoptosis para luego inducirla y a su vez producir la detención del ciclo celular (Wang, 2009).

Se han investigado los efectos de SiO₂ en fibroblastos de ratón Balb/3T3, centrándose en la citotoxicidad y genotoxicidad de células. Los resultados obtenidos utilizando NP de SiO₂ con diámetros entre 15 nm y 300 nm, con tiempos de exposición de hasta 72 h, no mostraron ningún efecto citotóxico sobre las células Balb/3T3. Además, tampoco presentaron ninguna transformación morfológica en células Balb/3T3 ni genotoxicidad. Para comprender si la ausencia de cualquier efecto tóxico podría resultar por la falta de incorporación de las NP de SiO₂ por células Balb/3T3, se investigó la absorción y la distribución intracelular de la exposición a NP de SiO₂ de 85 nm marcadas. Usando microscopía de fluorescencia, se observó que las NP de SiO₂ fluorescentes son internalizadas y se encuentran exclusivamente en la región citoplásmica. De este modo se ha demostrado que aunque las NP de SiO₂ se internalizan *in vitro* en fibroblastos de ratón Balb/3T3, no activan ningún efecto citotóxico ni genotóxico y no inducen la transformación morfológica, lo que sugiere que podría ser un componente útil en aplicaciones industriales (Chiara, 2012).

Por lo que se refiere a citotoxicidad, se reporta que al administrar 3 inyecciones consecutivas por vía intravenosa a ratas Wistar macho a las 4, 24 y 48 horas antes del sacrificio; las NP de sílice producen un aumento en el daño del ADN. No se observaron efectos genotóxicos a dosis más bajas, y el ensayo de

(Micronucleos) MN *in vitro* fue negativo. Se postula que las NP de sílice producen efectos genotóxicos secundarios a través la liberación de derivados oxidantes de células inflamatorias, similar a la descrita por el cuarzo. Tal mecanismo es apoyado por el aumento de la infiltración neutrofílica, necrosis y apoptosis en el hígado, y la inducción de los marcadores inflamatorios TNF y la IL-6 en plasma. Estos resultados fueron bastante consistentes entre los NP de sílice y el control de cuarzo, reforzando de esta manera el argumento de que los NP de sílice pueden actuar de una manera similar (Downs, 2012).

PECA

Los NM poseen diversas propiedades fisicoquímicas producto de su tamaño; el aumento de área de superficie, su composición química variable y la estructura de superficie y forma; son propiedades que tienen los NM para interactuar directamente con los sistemas biológicos y posteriormente alterar la señalización celular y la función. Aunque la interacción de los NM con las membranas lipídicas y su transporte intracelular subsiguiente no se conoce bien, se ha demostrado que pueden entrar en las células mediante diversos procesos endocitóticos. Estos procesos dependen más probablemente de las propiedades de superficie que pueden estar directamente relacionadas con su potencial genotóxico. Por tanto, es imperativo que los efectos directos sobre el ADN deben examinarse para proporcionar información preliminar sobre la genotoxicidad potencial de estos materiales (Jedd, 2010).

Aunque la familia PACA es ampliamente utilizada por su inocuidad, se ha estudiado la citotoxicidad de estas NP que puede ser inducida por diferentes vías, tales como 1) liberación de productos de degradación, 2) estimulación de las células y posterior liberación de mediadores de inflamación, 3) y la adherencia membrana.

En el primer factor, la citotoxicidad puede atribuirse a la presencia de productos de degradación; experimentalmente se ha expuesto a macrófagos a NP de PACA en donde sólo en presencia de poli (metilcianoacrilato) se observó perforación de la membrana celular. En contraste, no se observaron cambios morfológicos con poli (butilcianoacrilato) (Vauthier, 2003).

En otros estudios en donde se llevó a cabo la incubación de las NP con hepatocitos. La toxicidad celular se evaluó mediante una prueba de exclusión con colorante y por medición de las fugas de lactato deshidrogenasa. Las NP de Poli (butilcianoacrilato) no indujeron ninguna citotoxicidad a una concentración de 75 mg/mL. No obstante, daño de la membrana apareció en una concentración de polímero de 150 mg/mL. También, se ha apreciado que, los polímeros con cadenas laterales alquílicas cortas son más tóxicos que los polímeros con grupos alquilo más largos, por ejemplo, con poli (cianoacrilato de isobutilo), se observó una pérdida de adherencia seguida por la dilatación del retículo endoplásmico rugoso de las células. La perforación de la membrana celular se produjo más tarde como secuencia de daños. La toxicidad de las NP de PACA también se investigó mediante la medición de la inhibición del crecimiento de células de fibroblastos 3T3 Swiss (Vauthier, 2003).

El segundo mecanismo está implicado en la citotoxicidad producida por la adhesión de las NP de PACA a las membranas. A pesar de que los polímeros con cadenas alquílicas más largas son menos tóxicos, las NP de PECA son más citotóxicas en fibroblastos L929 que las NP de poli (metilcianoacrilato). La razón de esto es que el poli (metilcianoacrilato) se degrada muy rápidamente en el medio de cultivo y no se adhiere a la membrana celular. Por el contrario, el PECA es más citotóxico debido a que las partículas probablemente primero se adhieren a la membrana de la célula y después liberan sus productos. Finalmente, la liberación de mediadores inflamatorios es inducido por el contacto de las nanopartículas de PECA con las células, que muestra que podría estimular a los macrófagos (Vauthier, 2003).

Por otra parte, desde un punto de vista toxicológico, cabe destacar que la asociación de un fármaco con NP también pueden inducir una mayor concentración intracelular del fármaco y permitir incluso que medicamentos no difusibles intracelularmente puedan concentrarse en ciertos compartimientos intracelulares (lisosomas). Este enfoque se ha utilizado para mejorar la eficacia de ciertas drogas que pueden inducir toxicidad inesperada en el caso de compuestos con una baja citotoxicidad aparente, ya que suele ser mal transportado intracelularmente (Vauthier, 2003).

Otro estudio señala que su toxicidad, aunque baja (DL 50 de poli (isobulcianoacrilato) (PIBCA) en ratas: 242 mg / kg, DL 50 de poli (hexilcianoacrilato) (PHCA) en ratas: 585 mg / kg) (16) y (17), puede ser importante debido a que tienen una tasa de degradación rápida en comparación con otros polímeros utilizados en la administración de fármacos, tales como el ácido láctico y sus copolímeros con ácido glicólico (PAL / PAG) que se degradan de forma relativamente lenta *in vivo*. Además, sus productos de biodegradación puede ser más tóxicos que los de PLA y PLA / GA. Sin embargo, en el caso de dosificación múltiple (tratamiento crónico), el uso de la rápida degradación de cianoacrilato como portadores parece ser el más adecuado (Lherm, 1992).

- *Órganos blancos para NP de PECA y SiO₂*

La evaluación de la penetración y efectos biológicos de NP va en función del tipo de administración; por lo que se refiere a las NP administradas vía oral se puede decir que esta vía presenta muchos problemas debido a lo siguiente: Las diferencias interindividuales en la composición, el pH y el espesor de la capa de moco en el tracto gastrointestinal así como la flora y el tiempo de tránsito gástrico complican los experimentos *in vivo*. Loeschner en sus estudios con NP de Ag menciona que también existen variaciones relacionadas con la dieta y esto influye en la distribución de los NM en los órganos.

A pesar de ello los estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que la contaminación por partículas en el ambiente se asocia con enfermedades respiratorias y cardiovasculares, sobre todo en las personas de edades avanzadas. La sensibilidad del efecto toxicológico de las NP en diferentes edades fue investigada por primera vez para demostrar y explicar una diferencia relacionada con la edad.

La literatura reporta la eficacia que las nanoesferas de PACA cubiertas con doxorubicina ofrecen frente a la leucemia linfocítica L1210 como un modelo de tumor. En este estudio, al administrar una inyección intravenosa de nanoesferas de doxorubicina cargadas con poli (cianoacrilato de isobutilo); se encontró que era más eficaz contra la leucemia L1210 que el fármaco cuando se administra en su forma libre siguiendo el mismo programa de dosificación. Sin embargo, aunque el aumento de la vida útil del fármaco en los ratones inyectados con doxorubicina era dos veces mayor con respecto a la vida útil de la doxorubicina libre, no hubo sobrevivientes a largo plazo. La eficacia de nanoesferas de poli (Isohexilcianoacrilato) cargadas con doxorubicina contra la leucemia L1210 fue incluso más pronunciada que la de las nanoesferas de doxorubicina cargada en poli (cianoacrilato de isobutilo). Estudios llevados a cabo en homogenados totales de los hígados sanos y con metástasis mostraron captura extensa de doxorubicina por el hígado, sin una diferencia significativa en la concentración hepática entre animales sanos y tumefactados. Con el fin de dilucidar el mecanismo detrás del aumento de las nanoesferas cargadas con doxorubicina, las mediciones de doxorubicina se hicieron en ambos nódulos metastásicos y tejido hepático sano. Esto proporcionó información cuantitativa relativa a la distribución de medicamentos en estos tejidos. Durante las primeras 6 h después de la administración, la exposición del hígado a la doxorubicina era 18 veces mayor para nanoesfera asociada a la doxorubicina. Sin embargo, no existió evidencia de afinidad especial para el tejido del tumor; y las nanoesferas se observaron por microscopía electrónica dentro de las células de Kupffer (macrófagos). Sin embargo, en lapsos de tiempo posteriores, la cantidad de fármaco en el tejido del tumor aumentó en los

animales tratados con nanoesferas a 2,5 veces el nivel encontrado en los animales que recibieron doxorubicina libre (Vauthier, 2003).

Aunque los datos toxicológicos han demostrado que las nanoesferas cargadas con doxorubicina no son inesperadamente significativos o tóxicos para el hígado; en términos de tasa de supervivencia a dosis altas, pérdida de peso corporal y el aspecto histológico se sugiere que el efecto a largo plazo de la administración mencionada anteriormente tiene un aumento de 18 veces en la concentración de doxorubicina en el hígado; también se observó que la nanoesfera asociada a doxorubicina se acumula en la médula ósea, llevando a un efecto mielosupresor (Vauthier, 2003).

SiO₂

Con el paso del tiempo y con base en el conocimiento de sus aplicaciones en diversas áreas de estudio, las NP de sílice se utilizan cada vez más en diversas aplicaciones, tales como la agricultura y la medicina. En algunos de los modelos experimentales se ha observado que las ratas jóvenes, adultos, y ancianos que fueron sometidos a inhalar aerosoles que contienen nanopartículas de SiO₂ (24,1 mg/m³, 3,40 min/día) durante cuatro semanas. Los cambios observados fueron alteraciones séricas, inflamación, daño pulmonar y al corazón.

La inhalación de nanopartículas de SiO₂ en condiciones idénticas ha provocado alteraciones pulmonares y cardiovasculares en ratas viejas, sin embargo se ha observado un cambio menor en las ratas jóvenes y adultas, incluyendo la inflamación pulmonar, daño isquémico del miocardio, bloqueo aurículo-ventricular, y el aumento en la concentración de fibrinógeno y la viscosidad de la sangre. El riesgo de trastorno cardiovascular se observó sólo en la vejez (Zhen, 2008).

En otros ensayos, los estudios *in vivo* han demostrado que el hígado es uno de los órganos diana de NP de sílice. Sin embargo, los posibles mecanismos de

hepatotoxicidad causada por NP de sílice aún permanecen poco claros. También se han explorado las ERO mediadas por apoptosis inducida por las NP de sílice bien caracterizadas a 14 nm en líneas celulares hepáticas humanas HepG2. Las NP de sílice en una administración de (25-200 g/ml) inducen una citotoxicidad dependiente de la dosis en las células HepG2. Además se logró demostrar que las NP de sílice pueden inducir estrés oxidativo en forma dependiente a la dosis, esto por la inducción de ERO, peroxidación lipídica y la depleción del glutatión (GSH). Asimismo se observó que las nanopartículas de sílice inducen apoptosis en células de hígado humano y está mediado por las ROS así como también se encuentra regulada a través de p53, Bax/Bcl-2 y vías de caspasas (Javed, 2012).

Mientras que la inhalación de NP causa daño pulmonar, las NP de SiO₂ puede ser transportadas en la sangre y depositarse en los órganos diana donde ejercen sus efectos tóxicos potenciales. El sistema renal se considera como objetivo secundario. Sin embargo, la información toxicológica de su efecto sobre las células renales y los mecanismos implicados siguen siendo escasos. Algunos análisis realizados evalúan la citotoxicidad de las NP de SiO₂ a diferentes tamaños; donde se han investigado dos renales líneas de células tubulares proximales (HK-2 humano y LLC-PK1 porcino). Las vías moleculares involucradas fueron estudiadas con especial atención en la implicación del estrés oxidativo. En primer lugar, la evidencia de la internalización de partículas se obtuvo mediante microscopía electrónica de transmisión y las técnicas convencionales de citometría de flujo. El uso de inhibidores específicos de las vías de endocitosis mostró un proceso de internalización por macropinocitosis y endocitosis mediada por clatrina para NP de SiO₂ de 100 nm. La toxicidad fue dependiente del tamaño y tiempo (24 h, 48 h, 72 h). En segundo lugar, el análisis del estrés oxidativo sobre la base de la evaluación de las ERO producción (DHE, dihydroethidium) o la peroxidación lipídica (MDA, malondialdehído) demostró claramente la implicación del estrés oxidativo en la toxicidad de las NP de SiO₂ a 20 nm (Passagne, 2012).

- *Métodos para la estimación de la citotoxicidad y genotoxicidad in vivo*

Genotoxicidad

Aunque los NM prometen revolucionar nuestro estilo de vida, debido a que tienen propiedades físico-químicas únicas, con propiedades benéficas que superan a las de las sustancias tradicionales. Tales características incluyen la conductividad eléctrica o térmica mejorada, catalizadores más eficientes o la mejora de los vehículos para suministro de fármacos. Por consiguiente, los NM tienen aplicaciones potenciales en una amplia variedad de entornos industriales, además de la salud médica y productos de consumo. Por lo que es necesario definir una estrategia de identificación de peligros y gestión de riesgos para estos nuevos productos es cada vez más importante y es un tema muy debatido. Un aspecto importante de la identificación del peligro incluye la posibilidad de un nuevo agente para inducir genotoxicidad, como daños en el material genético puede resultar en la inducción o promoción de la carcinogénesis, además de los impactos reproductivos, esto si el ADN de las células germinales se ve comprometida (Doak, 2012).

Debido a la variedad de mecanismos de los NM que conducen a daño del ADN y la gama de eventos mutagénicos que pueden producirse como resultado de ello, se requiere de una batería de sistemas de ensayo para establecer el potencial genotóxico de una sustancia bajo investigación. Para la aprobación reguladora de compuestos químicos y farmacéuticos, es necesaria una batería de pruebas bien definidas para evaluar su genotoxicidad (mutaciones puntuales, aneuploidía y la fragmentación cromosómica). Los mecanismos de genotoxicidad se aprecian en dos categorías principales: mecanismos primarios y secundarios. Los mecanismos primarios son aquellos inducidos por los mismos NM a nivel celular de forma individual y puede ser el resultado de la interacción directa o indirecta entre el NM y el ADN (y/o su aparato regulador). Los agentes que actúan directos son aquellos que son reactivos con el ADN, es decir que entran en contacto directo con el material

genético, causando daño físico o químico. En contraste, los agentes que actúan indirectamente inducen genotoxicidad al dañar biomoléculas intermedias que son a menudo componentes de la maquinaria de la división celular y su mal funcionamiento posterior causa aberraciones en el ADN (Doak, 2012).

Las directrices actuales de las pruebas en gran parte incluyen el ensayo *in vitro* de la mutación bacteriana inversa en el gen (Ames, OCDE 471), un ensayo *in vitro* de células de mamíferos (por ejemplo, el ensayo de HPRT, ensayo en linfoma de ratón CT, OCDE 476) y un ensayo de micronúcleos *in vitro* en células mamífero y aberraciones cromosómicas. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que el régimen en pruebas *in vitro* para los productos químicos necesita modificación con el fin de minimizar los falsos positivos (Doak, 2012).

La prueba de AMES es uno de los ensayos de mutación inversa bacteriana utilizado para determinar la mutagenicidad de las sustancias exógenas. El examen identifica compuestos mutagénicos capaces de revertir mutaciones puntuales en histidina o genes de biosíntesis de triptófano en *Salmonella typhimurium*, respectivamente, y la capacidad de restauración de las bacterias para generar estos aminoácidos esenciales. Por lo general, es necesario una combinación de 4 o 5 cepas de *S. typhimurium* para detectar una amplia gama de sustitución de bases o de desplazamiento de marco de lectura. La facilidad y la eficacia de coste del sistema de prueba hace que sea ampliamente utilizado en el análisis de seguridad de las sustancias químicas. Es una prueba esencial dentro de la batería de ensayos para la evaluación de genotoxicidad (Doak, 2012).

El ensayo de micronúcleos *in vitro* determina rápidamente la frecuencia de daño cromosómico inducido por un agente de prueba. Ha ganado popularidad como la prueba de elección en el ensayo de aberración cromosómica, ya que es sustancialmente más rápida de realizar, más fácil de analizar y detecta fácilmente clastógenos. Por lo tanto, el ensayo de micronúcleos ahora se recomienda como uno de los sistemas de ensayo *in vitro* para caracterizar la genotoxicidad de agentes químicos y farmacéuticos (Collins, 2004).

El ensayo cometa, también conocido como electroforesis en gel unicelular, es capaz de estimar el aumento en el nivel de fragmentaciones en la molécula de ADN (1 x10¹⁰ Da) de células eucarióticas individuales de cualquier organismo, como resultado de la exposición a sustancias genotóxicas (agentes alquilantes o intercalantes), radiaciones UV y daño oxidativo. Este ensayo se ha probado en organismos tales como plantas de fríjol ancho (*Vicia faba*), poliquetos (*Nereis virens*), lombrices (*E. fetida*), mejillones (*Mytilus edulis*), ostiones (*Crasostrea virginica*), peces (*Onchorynchus mykiss*), ranas (*Rana clamitans*), ratas y ratones. El ensayo inicialmente fue desarrollado para llevarse a cabo en células de mamíferos (ratas), enfocado hacia toxicología humana (Collins, 2004).

En esta técnica se puede observar claramente un efecto dosis–respuesta, aún en la presencia de niveles bajos de genotóxicos en el ambiente (Mitchelmore, 1998) y tiene la capacidad de medir el daño acumulativo al ADN causado por la mezcla de contaminantes genotóxicos a los cuales se ven expuestos los organismos. El ensayo cometa se basa en el hecho de que el ADN en condiciones normales se encuentra enrollado en el núcleo, mientras que al estar dañado o roto y ser sometido a un campo electromagnético, éste migrará más que un ADN sin daño. En condiciones alcalinas la técnica es capaz de evidenciar rompimientos de una sola hebra, sitios retardados de reparación y sitios alcali lábiles; mientras que a un pH neutro, la técnica es capaz de evaluar rompimientos de doble hebra en el ADN. La imagen que se puede observar después de exponer las muestras a una electroforesis asemeja a un cometa, en donde la cabeza representa el ADN sin dañar, mientras que la cola del mismo es el ADN dañado o fragmentado.

Es un método que bien puede ser utilizado rutinariamente en células obtenidas de organismos en laboratorio o *in situ*, debido a su sencillez y rapidez. De hecho, es un método que ya se utiliza para probar la genotoxicidad de nuevos compuestos antes de ser liberados al mercado, para detectar la presencia de contaminantes genotóxicos en el ambiente, para el biomonitoreo humano y la epidemiología molecular, así como para investigación básica del daño al ADN y sus sistemas de reparación (Avishai, 2002 y Cotelle, 1999).

Existen diversos trabajos tratando de investigar algunos de los efectos de las NP de SiO₂. Uno de ellos fue llevado a cabo en fibroblastos de ratón Balb/3T3, centrándose en la transformación de células de citotoxicidad y genotoxicidad. Los resultados obtenidos utilizando unas NP de SiO₂, con diámetros entre 15 nm y 300 nm; en tiempos de exposición de hasta 72 h, no han mostrado ningún efecto citotóxico sobre las células Balb/3T3 (Jedd, 2010).

Citotoxicidad

Existen diferentes ensayos para determinar la citotoxicidad asociada a la exposición de agentes xenobióticos como las NP, con el fin de estimar la viabilidad celular. Uno de los mecanismos por los que las ERO causan daño a las células es mediante la peroxidación de lípidos. La peroxidación de lípidos puede dar lugar a daño de la membrana celular y la formación de subproductos tóxicos reactivos, los productos de la peroxidación lipídica se utilizan como marcadores de estrés oxidativo posteriores a las 3, 6 y 24 h del tratamiento con las formulaciones de NP. Los productos de la peroxidación de lípidos, los hidroperóxidos de lípidos, y aldehídos, tales como malondialdehído (MDA), se puede medir a través de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). En la determinación de TBARS; existen múltiples protocolos propuestos para estos procedimientos y pueden clasificarse en cuatro tipos: 1) los que proceden por extracción acuosa de la muestra en medio ácido y reacción con el ácido tiobarbitúrico; 2) los que proceden sobre la fracción lipídica previamente extraída; 3) los que separan el MDA (malonaldehído) por destilación y luego desarrollan la misma reacción; 4) y los que desarrollan la reacción sobre la muestra entera. Estos métodos han adquirido aceptación por su sencillez, bajo costo y relativa rapidez, mientras que la destilación implica mayores riesgos de inducir la oxidación y los métodos cromatográficos no están libres totalmente de interferencias, no son mucho más sensibles, y sobre todo son más costosos y complejos (Nollet).

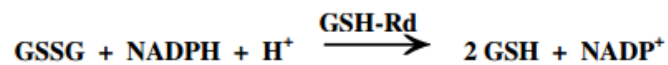
El método de Botsoglou, que trabaja con el extracto acuoso ácido de la muestra, consiste en tratar la muestra (2 g) con solución acuosa de ácido tricloroacético (5% p/v) y solución de BHT (0,8% p/v) en hexano, y homogeneizar con un homogeneizador de alta velocidad. Se centrifuga y se descarta la fase hexánica. Se filtra la fase acuosa y se toma una alícuota de la misma que se somete a reacción con la solución de TBA (0,8% p/v), durante 30 min a 70 °C. Posteriormente se enfría la solución y se lee en el espectrofotómetro, frente a un blanco constituido por la mezcla de reactivos, y se calculan los µg de MDA a partir de una recta de calibrado realizada con soluciones patrón. Se utiliza normalmente como patrón el 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), como tetraetoxiacetal del malondialdehído, que origina MDA cuando se trata en caliente en medio ácido (Nollet).

La variante de Botsoglou en lugar de registrar directamente la absorbancia a 530-535 nm, registra la tercera derivada y mide la altura del pico a 521.5 nm. El autor ensayó el método en una larga serie de alimentos y tejidos y encontró unos valores de recuperación óptimos, con una excelente precisión (coeficientes de variación entre 0,8 y 4.5%). Grau y colaboradores modificaron levemente el método propuesto por Botsoglou y consiguieron aumentar significativamente su precisión, cuando lo aplicaron a muestras de muslo de pollo (Seong-Dae, 2006). Este ensayo, se puede llevar a cabo tanto en los medios de cultivo celular como en el lisado celular, donde el MDA se combina con el ácido tiobarbitúrico en una estequiometría 1:2 para formar un aducto fluorescente que puede ser medido a una longitud de onda de excitación de 521 nm y una longitud de onda de emisión de 552 nm (Potter, 2011).

Otro ensayo para evaluar la citotoxicidad es la determinación de GSH (glutati6n); la glutati6n reductasa (GSH-Rd) es una flavoenzima dependiente del nicotinam6n aden6n dinucle6tido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducci6n del glutati6n oxidado (GSSG) a glutati6n reducido (GSH) el cual ser6 utilizado por la glutati6n peroxidasa (GPx) para la reducci6n del per6xido de hidr6geno (H₂O₂) y de lipoper6xidos (L-OOH), los cuales son elementos t6xicos t6xicos a nivel

intracelular y que se han asociado con diferentes condiciones patológicas (Anderson, 1997).

La actividad de la enzima GSH-Rd fue determinada siguiendo la oxidación del NADPH a NADP⁺ durante la reducción del glutatión oxidado (GSSG)



Los niveles totales de glutatión se pueden determinar utilizando el método de Griffith. El glutatión total es evaluado por el procedimiento de reciclaje enzimático en el cual, el GSH es oxidado por el ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y reducido por el NADPH en presencia de GSH-Rd. La formación de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) es monitoreada a 412 nm. El contenido total de glutatión de la muestra puede ser calculado por comparación del valor observado con una curva estándar generada a partir de concentraciones conocidas de GSH (Anderson, 1997).

Por lo que se refiere al Ensayo con Lactato D-Deshidrogenasa; se puede decir que la LDH es una enzima citosólica soluble que sirve como un indicador de la muerte celular lítica ya que se liberan fácilmente en el medio extracelular después de daño de la membrana celular que resulta de la apoptosis o necrosis. Aunque se acepta ampliamente como un marcador de la muerte celular, debe tenerse en cuenta que esta prueba es simplemente un índice de integridad de la membrana celular, y en ciertas circunstancias puede ser positivo, incluso cuando el recuento de células no se modifica significativamente. Una serie de kits disponibles comercialmente también se han desarrollado. En un kit de Promega, una parte alícuota de medio celular reacciona con una sal de tetrazolio que, a través de NADH generado por la liberación de LDH, se convierte en un producto final de formazan rojo que se lee en un espectrofotómetro. Para la lisis completa de las células se utiliza un tampón de lisis, que es un control positivo en este ensayo. Los valores de DO de los grupos de tratamiento se expresan como porcentaje de liberación de LDH en relación con los valores de LDH de células completamente lisadas. La cantidad

de LDH también se puede evaluar cuantitativamente mediante la generación de una curva estándar utilizando estándares que contienen cantidades conocidas de LDH. Se ha usado este ensayo rutinariamente *in vitro* y en muestras de lavado broncoalveolar de los roedores para demostrar la citotoxicidad seguida de la exposición al amianto (Jedd, 2010).

La citotoxicidad de los NM utilizados en diversos estudios se han evaluado mediante el ensayo de LDH. Por ejemplo, se ha estimado la liberación de LDH en células epiteliales de pulmón humano (16HBE14o) tratadas con NP que consisten en gelatina porcina, albúmina de suero humano (ASH), y PACA. Las NP de gelatina y ASH no mostraron aumentos relacionados con la dosis en la liberación de LDH, mientras que las NP PACA causaron citotoxicidad, de lo cual parte el uso de las NP de gelatina y HSA para uso en la administración de fármacos o estudios de terapia génica (Jedd, 2010).

IV. Estrés oxidativo

En los últimos años se ha generado una verdadera revolución en el campo de las investigaciones relacionadas con el estrés oxidativo, sobre todo debido a la relación que se cree existe entre éste y el envejecimiento. Aunque este tópico aún no se ha estudiado debidamente, no es menos cierto que si han salido a la luz otra serie de resultados, que permiten establecer que la mayoría de las enfermedades crónicas están muy implicadas con el desequilibrio entre los fenómenos de oxidación y reducción del cuerpo humano.

- *¿Qué es?*

El estrés oxidativo (EOx) se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas (ER) y radicales libres (RL), que provocan daño oxidativo a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa. Este daño se relaciona con el envejecimiento y con más de 100 padecimientos. El daño celular que producen las ER y los RL, ocurre en los enlaces de proteínas, los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula, ocasionados por la activación de una reacción en cadena. Esto induce a que se presenten diversas enfermedades, como diabetes, aterosclerosis, procesos inflamatorios, el de isquemia/reperfusión, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, cataratas, depresión, diversos tipos de cáncer, entre otros (Gracy, 1999).

- *Radicales Libres y Especies Reactivas*

Los RL son moléculas que contienen un electrón (e^-) no apareado, ésta característica los hace sumamente reactivos y capaces de dañar a otras moléculas, lo que a su vez las convierte en moléculas muy reactivas, capaces de provocar una reacción en cadena que causa daño oxidativo, desde células hasta tejidos. Las ER incluyen a las especies reactivas de oxígeno (ERO), hierro (ERH), cobre (ERC), así como a las de nitrógeno (ERN). Estas especies se forman como productos del metabolismo de los RL y aunque no todas son de esta clase, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en RL, lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células (Sánchez, 2004 y Rodríguez, 2001).

- *Fuentes biológicas de RL*

La mitocondria constituye la principal fuente de RL. Éstos se producen a nivel de la cadena de transporte de e⁻ y fosforilación oxidativa. Este transporte es a través de la membrana interna mitocondrial, en donde se genera un gradiente electroquímico de protones que aporta la energía necesaria para producir adenosin trifosfato (ATP). En este proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno actúa como aceptor final de e⁻, lo que le confiere en más del 95% de estas reacciones un total de 4 e⁻ de moléculas con producción de 2 moléculas de agua. Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar 1 ó 2 e⁻ al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los RL (Rodríguez, 2001).

Otra fuente son los peroxisomas, organelos del citosol muy ricos en oxidasas y que generan peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas) y transformado en agua. Los leucocitos polimorfonucleares son otra fuente importante, al activarse por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (complemento, interleucinas, etc.) Los leucocitos poseen en la membrana la enzima NADPH oxidasa generadora de oxígeno, que en presencia de hierro se transforma en un potente tóxico ión oxidrilo (OH⁻). Esta situación se da en los procesos inflamatorios (Rodríguez, 2001).

La enzima xantina deshidrogenasa predomina en los endotelios normalmente depura las xantinas (isquemia, estimulación del Ca⁺, etc) y genera anión superóxido (O₂⁻). Se puede apreciar que los RL se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables por los mecanismos celulares de defensa, sin embargo, en situaciones patológicas, esta producción se incrementa y provoca el estado de EOx (Rodríguez, 2001).

Las células de nuestro cuerpo están expuestas constantemente a las reacciones de óxido-reducción y un ejemplo es la transformación de los alimentos ingeridos en sustratos más simples, de los cuales es posible obtener energía. Durante el proceso de reproducción celular se consume oxígeno y se genera ATP,

lo que origina productos tales como bióxido de carbono y agua. Sin embargo, durante esta transformación normal, se producen ER y RL.

- *¿Porque es importante su estudio?*

A mediados del siglo XX se sugirió por primera vez que los RL podían causar enfermedades degenerativas y estrés en órganos, debido a la alta inestabilidad atómica de los mismos. Los RL al colisionar con una macromolécula la oxida al sustraerle un e-, esto provoca que pierda su función específica en la célula (Dorado, 2003). Dicho daño puede causar oxidación de lípidos, proteínas, hidratos de carbono y efectos genotóxicos por la oxidación de nucleótidos (Lu, 2011), lo que produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, citotoxicidad y apoptosis (Dorado, 2003).

Los lípidos, son los más susceptibles al daño por los RL, específicamente los poli-insaturados que son fácilmente oxidables. El proceso de oxidación de los lípidos es llamado peroxidación lipídica y los productos de estas reacciones se denominan lipoperóxidos (LPO). En este sentido, las membranas son ricas en ácidos grasos poli-insaturados, de ahí que este proceso dañe directamente la estructura de la membrana celular e indirectamente a otros componentes celulares por la producción de aldehídos reactivos (Dorado, 2003).

Por otra parte, el daño que causan los RL a las proteínas es un proceso irreversible, el cual puede incrementar el enrollamiento erróneo de las estructuras secundarias o la pérdida de la formación de las estructuras terciaria y cuaternaria. Esto se debe a que todos los residuos de aminoácidos están sujetos al ataque por OH-, sin embargo, los aminoácidos que se oxidan con más frecuencia son la fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina y tal oxidación forma las proteínas carboniladas, que favorece el entrecruzamiento entre proteínas o con

otras biomoléculas como la glucosa (glucosilación). Estos cambios conformacionales pueden hacer a las proteínas más susceptibles de proteólisis, desnaturalización o producir pérdida de su actividad biológica (Sánchez, 2004).

La oxidación de ADN dependiente de las ERO y ocurre de forma parecida a la oxidación de proteínas y es sitio-específica. Involucra una reacción entre ADN, metales de transición y H_2O_2 . El ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo. La evidencia disponible indica que el escape de e^- , que conduce a la formación de O_2^- y H_2O_2 , ocurre en los complejos I, II y III de la cadena respiratoria por la autooxidación de algunos componentes (Dorado, 2003). Esta oxidación al ADN produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de expresión por el daño al gen específico, que puede provocar entrecruzamiento de proteínas-ADN, intercambio de cromátides hermanas, alteración a la estructura de la desoxirribosa-fosfato y oxidación de las cuatro bases nitrogenadas. La oxidación de la desoxirribosa puede inducir liberación de bases y rompimiento de cadena sencilla en las hebras de ADN, lo que puede producir la formación de micronúcleos (MN, conocidos en hematología como cuerpos de Howell Jolly) (Schmid, 1975). La reactividad del OH hacia la desoxirribosa varía considerablemente y los carbonos 4 y 5 resultan ser los más susceptibles. Así pues, la lesión que se observa con más frecuencia es el rompimiento de la hebra, mediado por el hierro y H_2O_2 (Rodríguez, 2001).

Por lo anterior, el daño ocasionado por el EOx a la célula puede ocurrir por muchas rutas, pero independientemente de cual sea la vía, es evidente que el exceso de RL y ER provocan desequilibrio en la homeostasis de la célula (81).

Glutación GSH como antioxidante

- *Importancia de GSH*

El tripéptido glutatión (GSH, γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina) es sintetizado en el citoplasma de las células por la acción consecutiva de dos enzimas: γ -glutamilcisteína (γ -GluCys) sintetasa (también conocida como glutamato cisteína ligasa, GCL por sus siglas en inglés) que utiliza glutamato y cisteína como sustrato para formar el dipéptido γ -glutamilcisteína, el cual es combinado con la glicina en una reacción catalizada por la glutatión sintetasa para formar GSH. El trifosfato de adenosina (ATP) es donador de energía para ambas enzimas. Las concentraciones intracelulares de glutatión son reguladas por la inhibición de la γ -GluCys sintetasa y por el producto final, GSH. Así, existe un equilibrio celular entre la síntesis y el consumo de este metabolito (Ballatori, 2009).

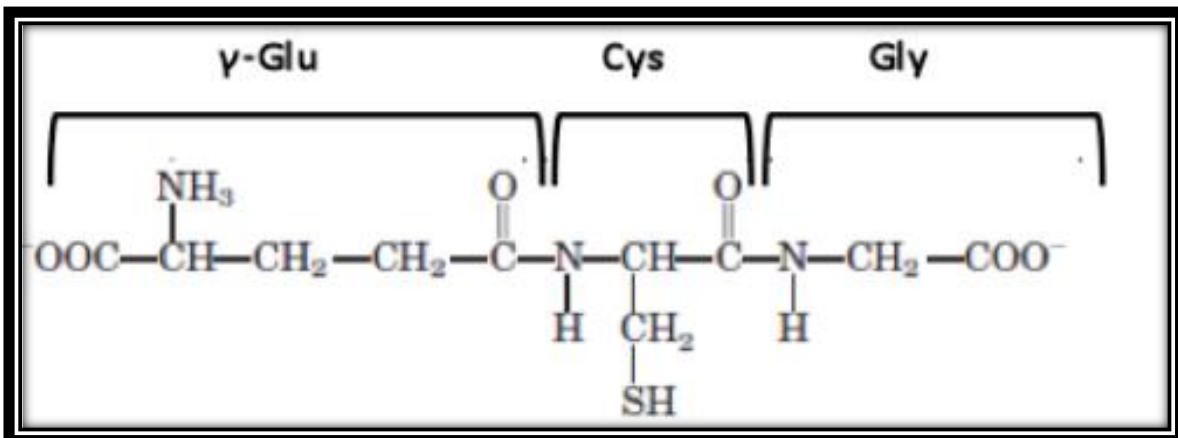


Imagen 4. Representación del glutatión reducido GSH (Martínez, 2011).

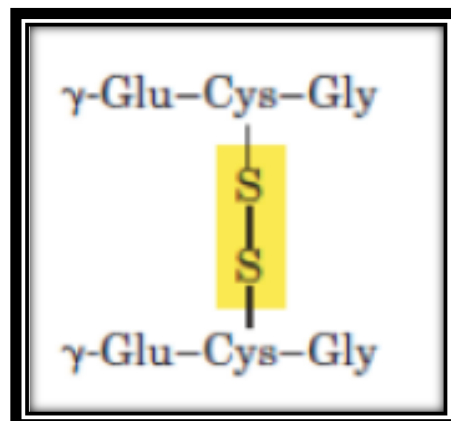


Imagen 5. Representación del glutatión oxidado (unido por un puente disulfuro) GSSG (Martínez, 2011).

El glutatión se encuentra en concentraciones promedio de 12 mM en células de mamíferos. Tiene importantes funciones como antioxidante, es parte importante de la detoxificación de xenobióticos, es cofactor para las reacciones de isomerización y también sirve como almacenamiento y transporte de cisteína (Ballatori, 2009). Además, es esencial para la proliferación celular y tiene un papel importante en la apoptosis, ya que la disminución de la cantidad de glutatión es permisiva para la activación de caspasas y la progresión de los mecanismos de apoptosis (Franco, 2009). Una función muy importante del glutatión es mantener el potencial de óxido-reducción de la célula, ya que mantiene en estado reducido los grupos tiol de las proteínas y así permite la generación de diversas cascadas de señalización intracelular; un ejemplo es la proteína cinasa C, que contiene varios residuos de tirosina en su centro catalítico, que le confieren sensibilidad al estado redox de la célula, lo que puede afectar la señalización mediada por esta enzima (Mceligot, 2005).

- *Metabolismo del glutatión*

Durante la detoxificación de las ERO, el glutatión está involucrado en dos tipos de reacciones: a) la interacción no enzimática con radicales como el anión superóxido, óxido nítrico y radical hidroxilo; b) proporcionando un electrón para la reducción de peróxidos en la reacción catalizada por la GPx. El producto final de la oxidación de GSH es glutatión oxidado (GSSG, constituido por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro) que es regenerado por la GSH-Rd, esta enzima transfiere electrones del NADPH al GSSG, reduciendo esta molécula. Durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GR el glutatión no es consumido, pero es reciclado y así puede de nuevo ser utilizado cuando se requiera. Por otro lado, durante la

generación de conjugados S-glutiación por las glutati3n-S-transferasas (GST) o por la liberaci3n de GSH por las c3lulas, el nivel total de GSH disminuye dentro de las c3lulas. Por lo tanto, el glutati3n utilizado para esos procesos tiene que ser remplazado por s3ntesis de novo. El GSH extracelular y los conjugados-S-gluti3n son sustratos para la ectoenzima γ -glutamilo transpeptidasa (γ -GT), esta enzima cataliza la transferencia del motivo γ -glutamilo del GSH (o de los conjugados-S-gluti3n) a una mol3cula aceptora y por lo tanto, generando el dip3ptido cisteinilglicina (o el conjugado-S-cisteinilglicina) y el γ -glutamiloconjugado. El dip3ptido cisteinilglicina puede ser hidrolizado por ectopeptidasas a ciste3na y glicina, amino3cidos que posteriormente pueden ser transportados por la c3lula a trav3s de transportadores espec3ficos y participar en la s3ntesis de *novo* de glutati3n (Dringen, 2000).

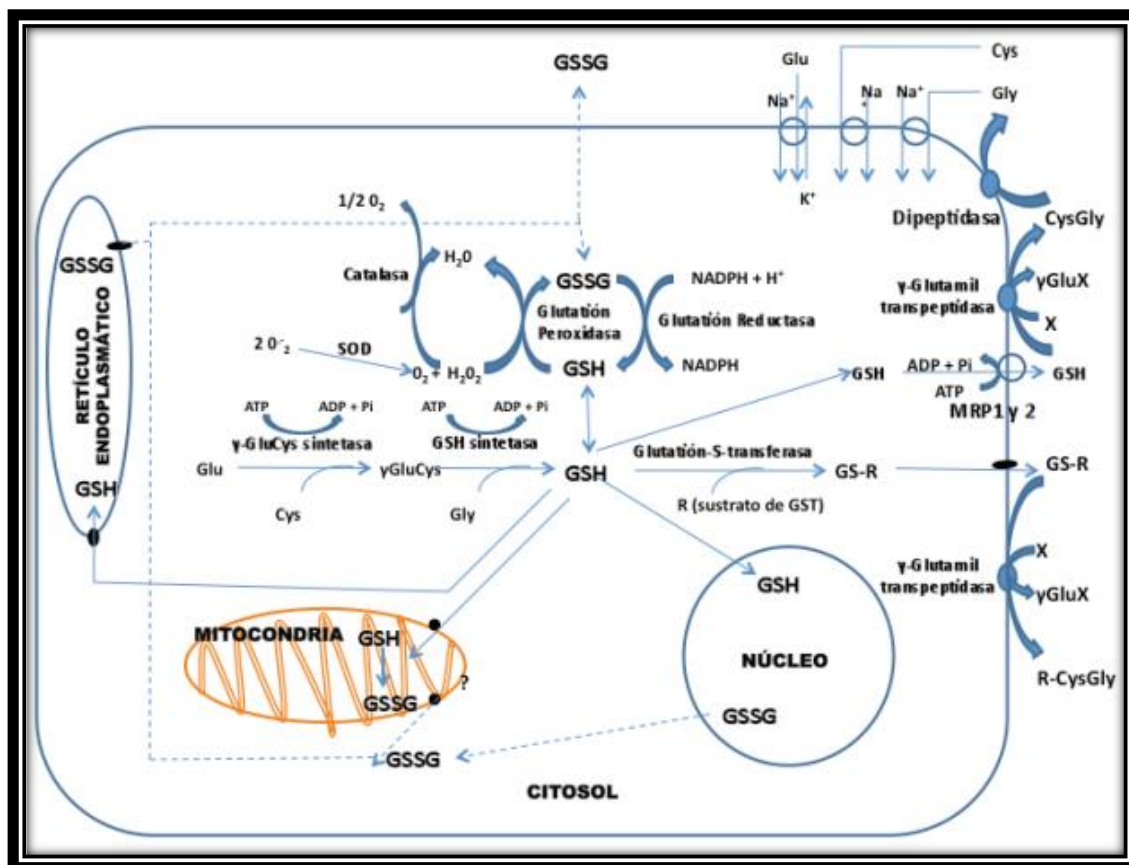


Imagen 6. Representaci3n del metabolismo de glutati3n en una c3lula. (Mart3nez, 2011).

- *Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico TBARS (Lipoperoxidación)*

El método para la estimación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) es uno de los más empleados para la evaluación de la oxidación lipídica en productos cárnicos y tejidos biológicos; su principio se basa en la reacción de condensación entre dos moléculas de TBA con una de malonaldehído en la que se produce un compuesto cromógeno de color rojo-rosa cuya concentración se determina espectroscópicamente a 532 nm (Badui, 1999).

El ensayo la estimación de TBARS tiene su origen en un trabajo publicado por Kohn y Liversedge sobre los productos de oxidación de los tejidos animales. Estos autores sugirieron que la sustancia reaccionante debía tratarse de un compuesto carbonílico (Vicario, 1997).

No obstante, la reacción no es totalmente específica y existe aun hoy una gran controversia sobre qué tipo de compuestos participan, además del malondialdehído. Esto ha llevado a que el índice sea más conocido en la actualidad como índice de TBARS, es decir, de sustancias reactivas frente al ATB. Varios factores hacen que la reacción se comporte de forma variable según el sustrato y que sean muy numerosos los trabajos que recoge la bibliografía en donde se discuten las condiciones idóneas de aplicación y tratamiento de cada muestra (Scribd.com, 2012).

Entre estos factores hay que considerar la composición en ácidos grasos de la muestra, la acidez del medio, la presencia de Fe u otros metales catalizadores de la oxidación, la presencia de antioxidantes. El malondialdehído se forma preferentemente en grasas que contienen ácidos grasos con elevado número de dobles enlaces, mientras que su proporción frente al resto de compuestos de oxidación es baja para grasas ricas en ácido oleico (Scribd.com, 2012).

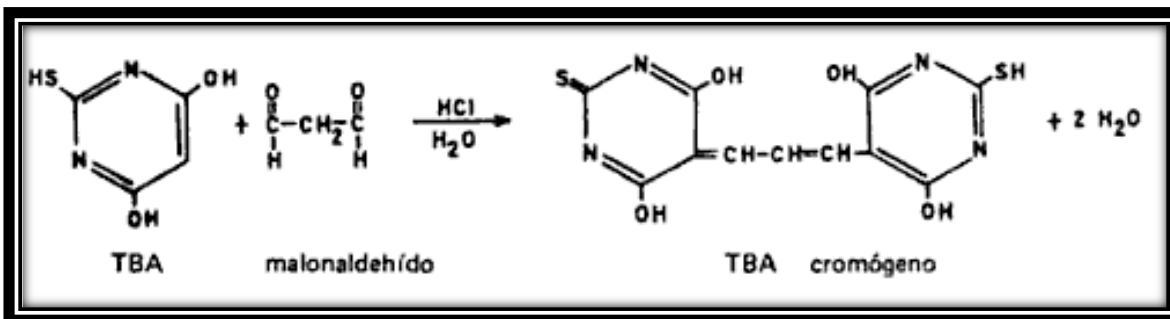


Imagen 7. Esquema sobre formación del color (Romero, 1997).

V. Planteamiento del problema

El transporte de fármacos y su distribución ha sido uno de los objetos de estudio más trascendentes en la farmacología. A lo largo del tiempo se ha demostrado que diferentes propiedades fisicoquímicas intervienen en su transporte a través de las membranas biológicas así como el tiempo en que ejercen su efecto terapéutico.

A pesar de que el estudio de NP o NM tiene ya más de 70 años, fue hasta 1970 aproximadamente que se empezaron a buscar aplicaciones como acarreadores biológicos de medicamentos. Han sido diversos y muy variados los estudios que se han realizado con respecto al tipo de fármacos que pueden ser transportados. Y aunque en dichos estudios se contempla la distribución en órganos específicos, en este trabajo se pretende evaluar el efecto citotóxico asociado a las nanopartículas.

La evaluación de la capacidad tóxica asociada a las NP en estudio realizadas en este trabajo permitirá conocer más de sus propiedades que pudieran utilizarse como fundamento para aumentar el tiempo de efecto farmacológico disminuyendo el efecto tóxico; teniendo en cuenta las propiedades de los polímeros utilizados.

VI. Objetivo general

Conocer los efectos citotóxicos asociados al estrés oxidativo inducido por NP de SiO₂, PECA, SiO₂/PECA y PECA/SiO₂ en ratas macho Wistar mediante la cuantificación de glutatión reducido y la estimación de la lipoperoxidación en pulmón y testículo.

VII. Objetivos específicos

Estimar el daño relacionado al estrés oxidativo inducido por NP de SiO₂, PECA, SiO₂/PECA y PECA/SiO₂ en pulmón y testículo de ratas macho Wistar

Evaluar el efecto dosis respuesta asociado a la exposición *in vivo* de los sistemas de NP en estudio en pulmón y testículo de ratas Wistar.

Determinar la cantidad de TBARS y GSH inducido por NP en muestras homogenadas de testículo y pulmón de ratas Wistar.

VIII. Hipótesis

Si la distribución de las NP en un organismo va en función de sus propiedades fisicoquímicas y dependiendo de la capacidad de éstas para atravesar las membranas biológicas se pueden tener diferentes efectos según el tipo de célula

del órgano al que sean afín; entonces la capacidad de cada uno de los tipos de célula para enfrentarse a los radicales libres podrá verse alterada por la dosis de exposición de NP, el tamaño de las mismas y el medio en que se encuentran suspendidas.

IX. Estrategia experimental

En este proyecto de investigación se estimó la cantidad de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la concentración de glutatión (GSH) en testículo y pulmón de ratas expuestas a sistemas de NP optimizados fabricados a base de dióxido de silicio (SiO₂) y polietilcianoacrilato (PECA). Las NP se administraron por vía intraperitoneal a ratas Wistar durante 8 días a dosis altas (DA) y dosis bajas (DB), en lotes de 12 individuos (4 ratas expuestas a dosis altas, 4 dosis bajas y 4 control de medio) y un lote como control negativo que no fue inoculado. Posteriormente las ratas fueron sacrificadas, de donde se extrajeron órganos como los testículos, riño, pulmón, hígado, etc. Que fueron conservadas a -20 C.

En la siguiente tabla se muestra la concentración de las DA y DB cada sistema de NP.

Tipo de NP		Determinación de dosis mg/ml	DOSIS BAJA (DB)	DOSIS ALTA (DA)
1	PECA	4.85	0.1212	1.2125
2	SIO2	5.6167	0.1411	1.4116
3	SIO2/PECA	5.7333	0.1433	1.4333
4	PECA/SIO2	9.05	0.2262	2.2625

Tabla 2. Concentración de sistemas de NP

Se utilizaron 2 tipos de controles, un “control medio” donde fue inoculado a las ratas el medio en que fueron suspendidas las NP y otros controles denominados “control T (Testículo) y control P (Pulmón)” y 4 sistemas de NP con dos diferentes materiales Dióxido de silicio (SiO₂) y polietilcianocrilato (PECA); a continuación se presentan sus propiedades fisicoquímicas:

Nanopartículas	SiO ₂	PECA	Sistema SiO ₂ /PECA	Sistema PECA/SiO ₂
Potencial z (mV)	-0.48	-4.27	-6.39	-0.766
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
Promedio	6.482	63.95	198.2	9.519

Tabla 1. Propiedades de NP de PECA, SiO₂/PECA y PECA/SiO₂

Para determinar los índices de estrés oxidativo en las muestras de pulmón y testículo se utilizaron las pruebas de TBARS y GSH, a continuación se mencionará el procedimiento.

Determinación TBARS

1. En un tubo eppendorf adicionar 200 µL de PBS/EDTA/Tritón/PMSF y agregar aproximadamente 0.35 g del tejido.
2. Sonicar en 3 pulsos durante 10 s cada muestra a 97 % amp.
3. Centrifugar 10 min/2000 rpm.

4. En un tubo eppendorf colocar 100 μL del sobrenadante y agregar 100 μL de ácido perclórico al 2.5 %, agitar con vórtex y dejar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
5. Transcurrido el tiempo, centrifugar la suspensión a 12000 rpm/ 10 min.
6. Recuperar 60 μL de muestra, agregar 440 μL de H_2O y 500 μL de TBA. Incubar durante 30 min. A 90°C y leer a 340 nm.

Determinación de GSH

1. En un tubo eppendorf adicionar 200 μL de PBS/EDTA/Tritón/PMSF y agregar aproximadamente 0.35 g del tejido.
2. Sonicar en 3 pulsos durante 10 segundos cada muestra a 97 % amp.
3. Centrifugar 10 min/2000 rpm.
4. En un tubo eppendorf colocar 100 μL del sobrenadante y agregar 100 μL de ácido sulfosalicílico al 2.5 %, agitar con vórtex y dejar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
5. Transcurrido el tiempo, centrifugar la suspensión a 12000 rpm/ 10 min.
6. Preparar reactivo de lectura de GSH: Realizar una solución de DTNB [0.4×10^{-4}] pesando 0.01080 g de DTNB más 1 mL de DMSO y aforar a 25 mL con buffer de fosfatos, adicionar 125 μL de EDTA. Tomar 2.5 mL de esta solución y agregar 2.5 mL de buffer de fosfatos.
7. Para llevar a cabo la determinación es necesario tomar 140 μL de la muestra y adicionar 160 μL de reactivo y leer a 405 nm.

Determinación de proteínas por el método de Bradford

1. En un tubo eppendorf adicionar 200 μ L de PBS/EDTA/Tritón/PMSF y agregar aproximadamente 0.35 g del tejido.
2. Sonicar en 3 pulsos durante 10 segundos cada muestra a 97 % amp.
3. Centrifugar 10 min/2000 rpm.
4. Recuperar sobrenadante
5. Separar 5 μ L para proteínas de Bradford
6. Llevar a cabo una dilución 1:5 de la muestra
7. Preparar reactivo de Bradford en una relación 1:4; utilizando agua desionizada.
8. De esta dilución tomar 10 μ L y agregar 140 μ L de agua desionizada; leer a 595 nm.

X. Discusión

Los resultados obtenidos nos permitieron conocer las concentraciones de GSH, TBARS y proteínas en tejidos (testículo y pulmón). Dichos tejidos fueron expuestos a DA y DB de NP de SiO₂, PECA SiO₂/PECA y PECA/SiO₂. Con base en estos resultados se procedió a determinar relaciones entre mmol de TBARS/ mg de proteína y de mmol de GSH/ mg de proteína cuyos gráficos resultantes presentaremos a continuación.

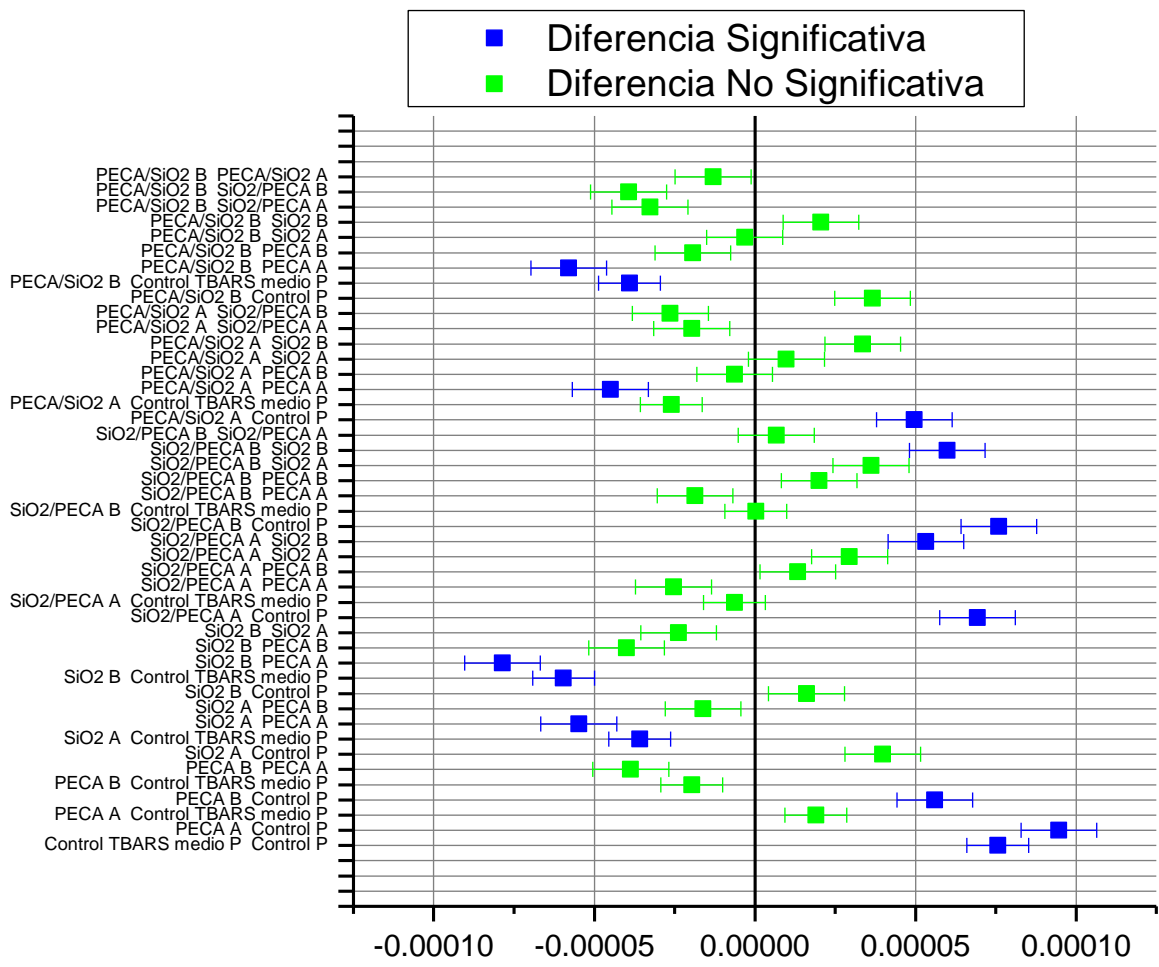


Grafico 1. Análisis múltiple de Medias Por el Método de TUKEY de TBARS para pulmón con todos los sistemas de nanopartículas utilizados. (Donde A son las dosis altas, B son las dosis bajas).

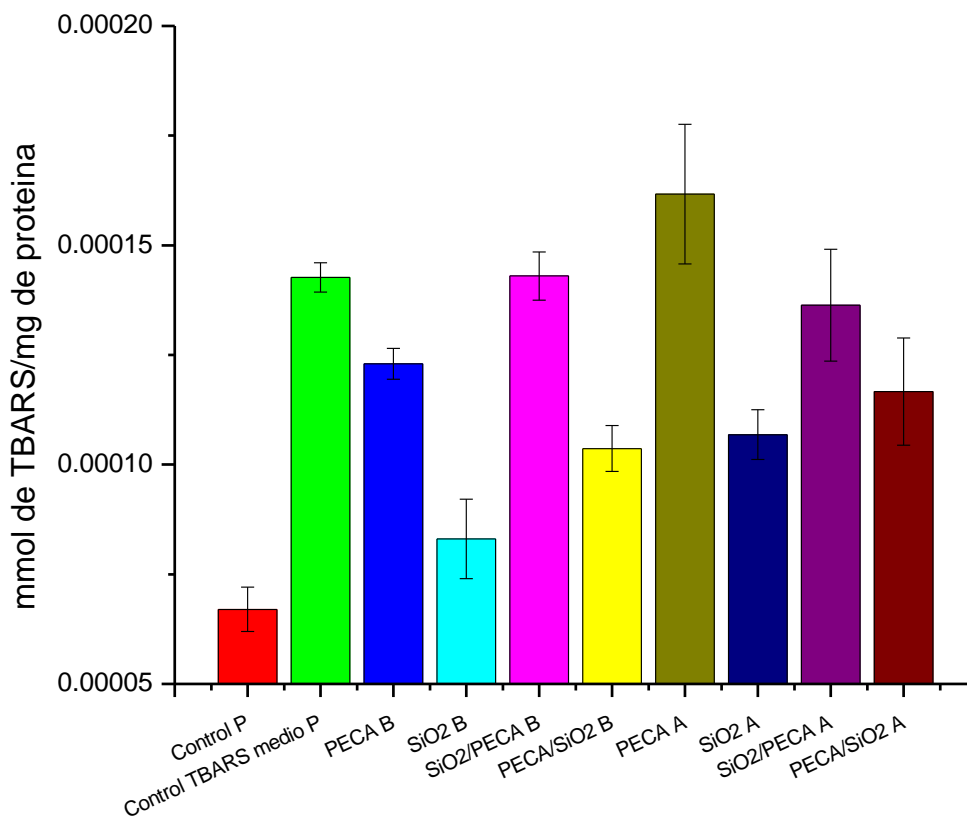


Grafico 2. Relación de mmol TBARS/ mg de Proteínas en pulmón. (Donde A son las dosis altas y B son dosis bajas).

En los gráficos 1 y 2 se puede observar la comparación realizada mediante el análisis múltiple de medias en los lotes de pulmón expuestos a los sistemas de NP antes mencionados; esto para los valores obtenidos de TBARS en donde se puede apreciar que las NP de PECA y el sistema híbrido SiO₂/PECA inducen una mayor producción de TBARS con respecto al control y las NP de SiO₂ inducen en menor escala un daño sobre las células. Lo anterior sugiere que las NP que presenten PECA en su superficie ya sea como NP simple (PECA) o sistema híbrido (SiO₂/PECA) tienen un mayor efecto en las células de pulmón. De lo anterior diremos que no se encontraron diferencias significativas al utilizar PECA a DA y el sistema híbrido de SiO₂/PECA a DA/DB así como el control que contenía el medio donde se encuentran suspendidas las NP (observar gráfico 1 del anexo); esto quiere decir que administrar estas NP no ejerce mucha diferencia en cuanto a los daños inducidos.

relacionados con el estrés oxidativo. Por lo demás; se logró demostrar que las NP y el medio donde se encuentran suspendidas generan una mayor producción de TBARS, así como que existe un efecto dosis respuesta en la administración de NP. Otro comportamiento importante que se observó en este órgano fue relacionado con los sistemas de NP compuestos (SiO_2/PECA y PECA SiO_2), el medio donde se encuentran suspendidas y PECA a dosis bajas; ya que no observaron diferencias significativas en las respuestas producidas por las NP anteriormente mencionadas (observar grafico 2 del anexo).

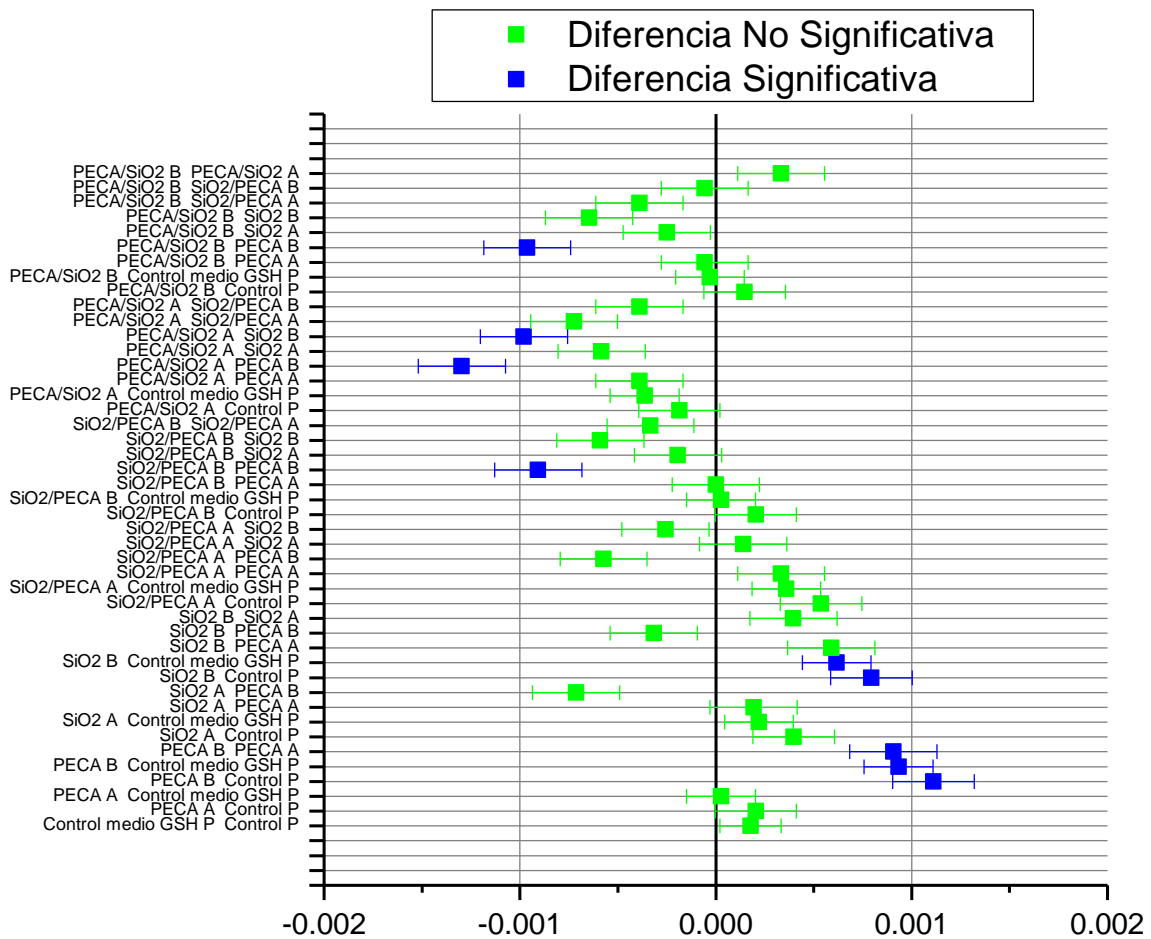


Gráfico 3. Análisis múltiple de Medias de GSH para pulmón con todos los sistemas de nanopartículas. (Donde A son las dosis altas y B son dosis bajas).

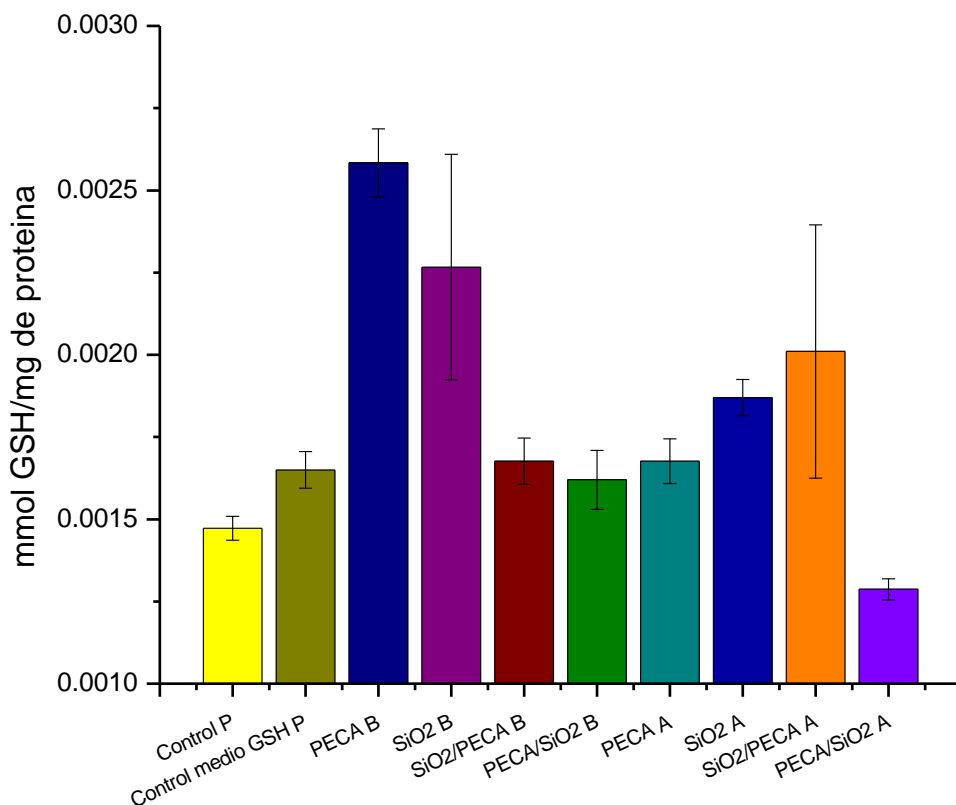


Grafico 4. Relación de mmol GSH/ mg de Proteínas en pulmón. (Donde A son las dosis altas y B son dosis bajas).

Nuevamente el sistema de NP que índice un mayor efecto es el de PECA aunque a DB y a diferencia de la determinación en TBARS, el medio donde se encuentran suspendidas las NP no induce un daño de consideración comparado con el control. El SiO₂ a DB también indujo una elevada producción de GSH, aunque en la mayoría de sistemas no se encontró un efecto dosis respuesta. También puede apreciar en el Grafico 3 que los lotes administrados con PECA a DB, SiO₂ a DB y el sistema híbrido de SiO₂/PECA a DA (observar Grafico 3 del anexo); son los que presentan con respecto a los demás lotes diferencias significativas. Con respecto a los demás lotes, se observó un comportamiento semejante, es decir, no existen diferencias en la producción de GSH al administrar estos sistemas de NP (Observar Grafico 4 del anexo) a las ratas; salvo el caso de PECA/SiO₂ a dosis altas, que es el único sistema que representa una diferencia significativa con respecto a los demás lotes. Un fenómeno encontrado en la exposición a los sistemas de NP fue que el PECA ejerce un mayor daño en el pulmón.

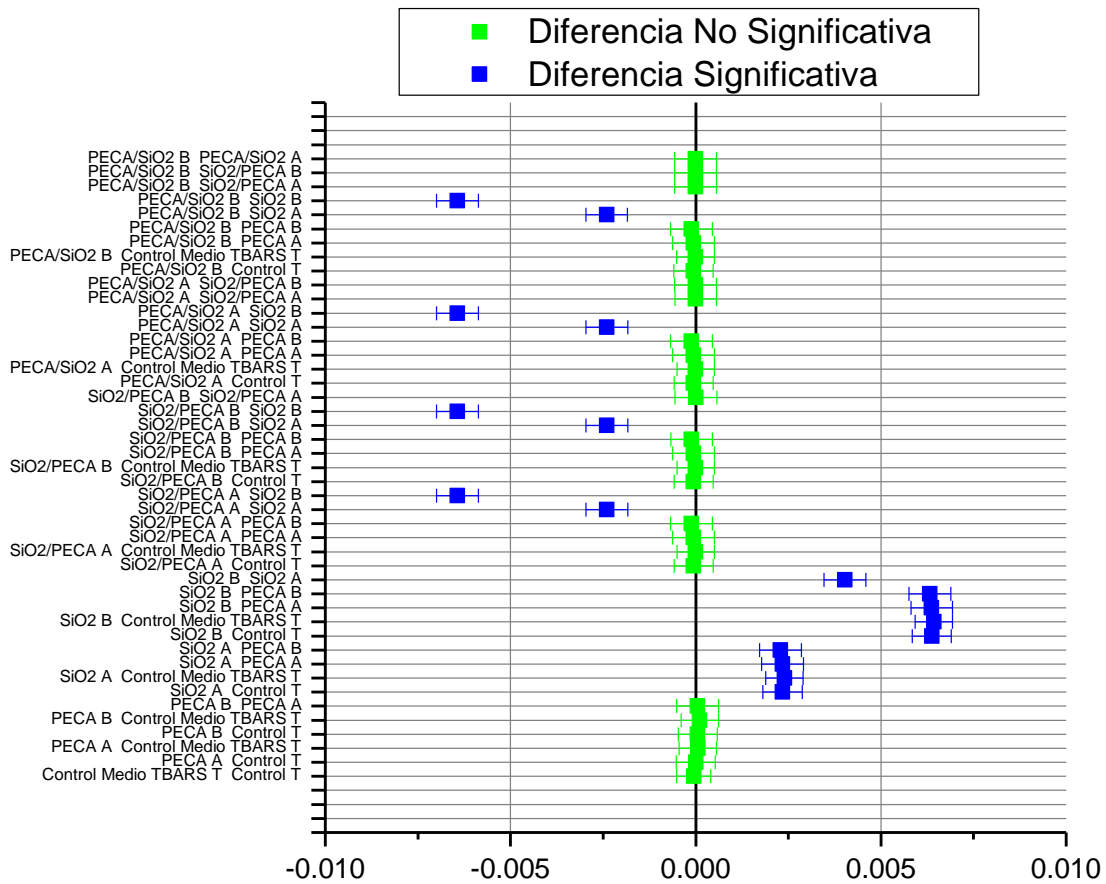


Grafico 5. Análisis múltiple de Medias de TBARS para testículo con todos los sistemas de nanopartículas utilizados. (Donde A son las dosis altas y B son dosis bajas).

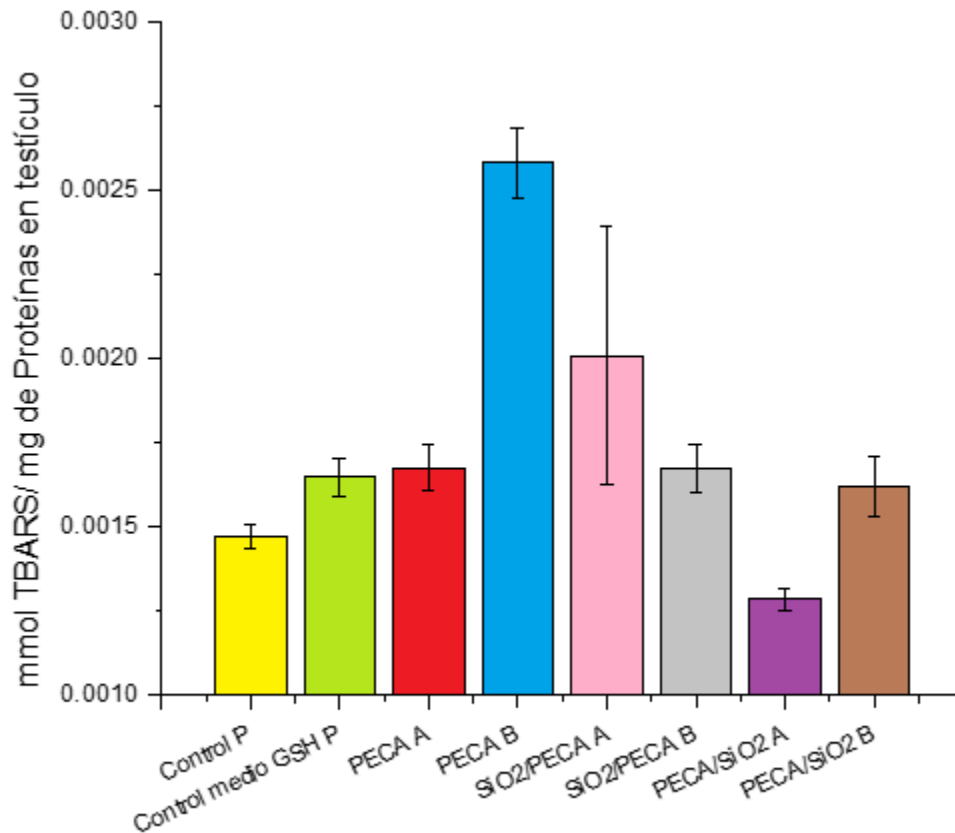


Grafico 6. Relación de mmol TBARS/ mg de Proteínas en testículo. (Donde A son las dosis altas y B son dosis bajas).

El siguiente punto trata la determinación de las TBARS en testículo que; como se aprecia en la Grafico 6 del anexo, la NP que representa una diferencia significativa con respecto a los demás sistemas es el SiO₂; esto queda demostrado por el análisis múltiple de medias donde se puede observar, en el grafico 5, que existen diferencias significativas entre el lote de SiO₂ a dosis altas y bajas en comparación con los demás sistemas; por lo que se refiere a estos tratamientos nos remitiremos al anexo 5, ya que podría parecer que no existen diferencias significativas entre los tratamientos de PECA SiO₂/PECA, PECA/SiO₂ y los controles, pero en esta figura queda de manifiesto que sí existen diferencias en los tratamientos, de lo que se puede decir que nuevamente que no se observa el fenómeno dosis- respuesta, con la excepción en el sistema híbrido de SiO₂/PECA.

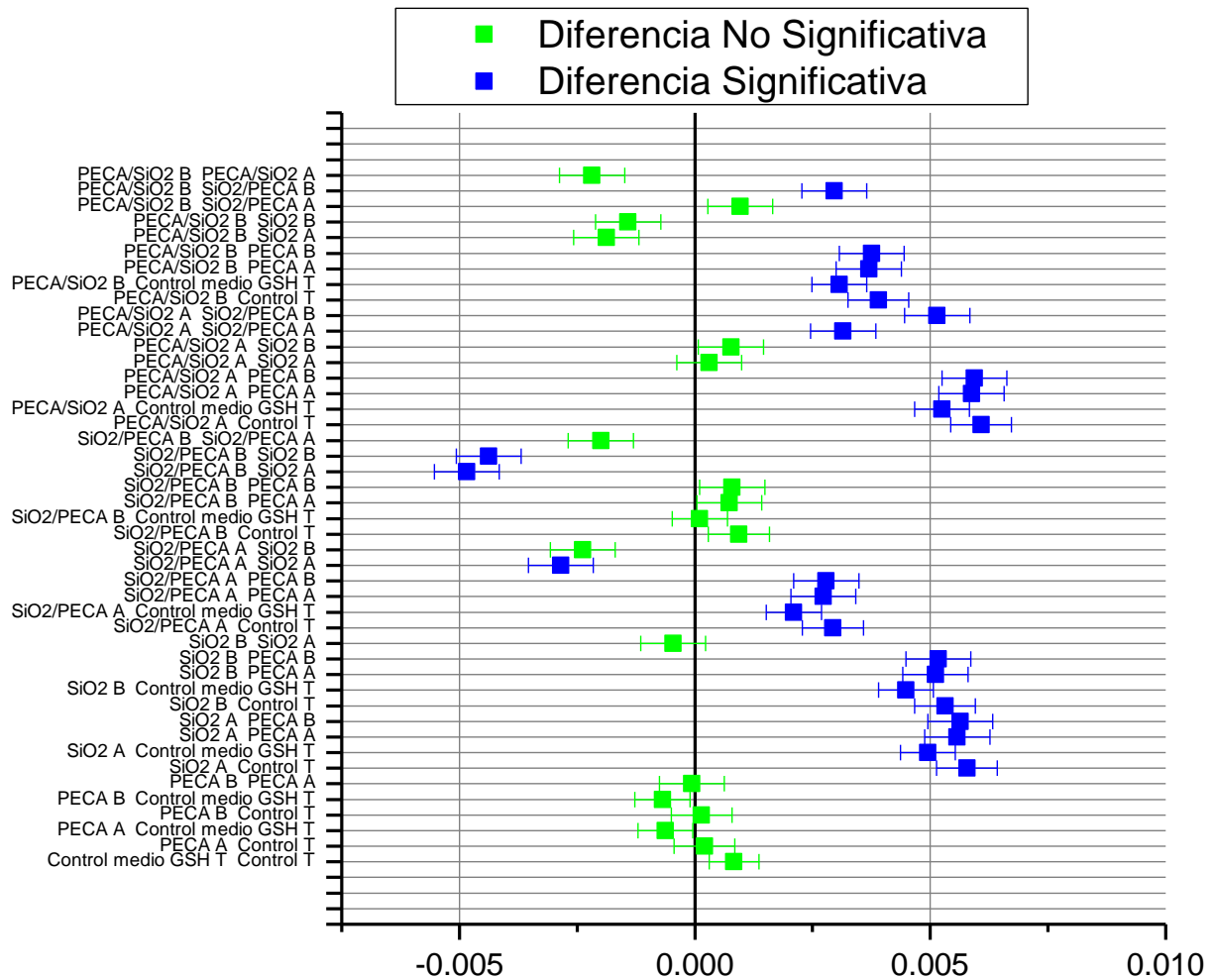


Figura 7. Análisis múltiple de Medias de GSH para testículo con todos los sistemas de nanopartículas utilizados. (Donde A son las dosis altas y B son dosis bajas).

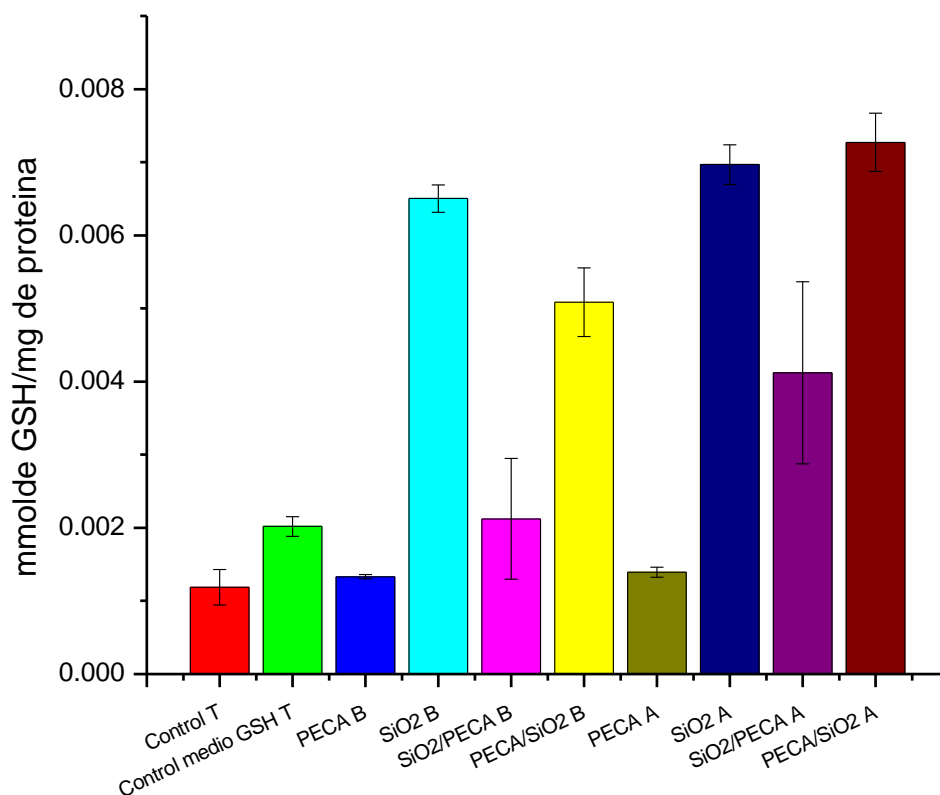


Figura 8. Relación de mmol GSH/ mg de Proteínas en testículo. (Donde A son las dosis altas y B son dosis bajas).

En cuanto a GSH en testículo, se puede apreciar en la figura 8 que se llevó a cabo el fenómeno dosis respuesta para todos los sistemas de NP. Primeramente diremos que las NP de SiO₂ y PECA/SiO₂ inducen una mayor producción de GSH; como se ha observado en los gráficos anteriores, las NP simples o sin conjugar ejercen un mayor daño pero aquí sucede algo diferente, PECA sin conjugar con otro polímero produce un menor daño en el tejido, de lo cual deriva que no podemos generalizar que las NP simples ejercen un mayor daño, en todo caso, según los resultados experimentales el SiO₂ representa un grado de estrés superior al producido PECA, esto en testículo.

En este estudio, se logró demostrar que los sistemas de NP ejercen un efecto sobre testículo y pulmón en sus diferentes dosis, ya que al ser administrados aumentó la producción de GSH y TBARS. Este comportamiento se atribuye a la

producción de radicales libres por la interacción de las NP con las células de los órganos antes mencionados (86). Experimentalmente se pudo observar que el órgano más eficiente para contrarrestar el efecto producido por los sistemas de NP de PECA fue el pulmón con respecto al testículo, mientras que el pulmón fue más eficiente para disminuir el daño a la exposición de NP de SiO₂.

Por otra parte, en el testículo se puede apreciar que no se producen de manera eficiente los antioxidantes cuando se exponen a NP de SiO₂, esto se puede relacionar con lo reportado en otros estudios, donde aún no se tiene claro el comportamiento del testículo y la vulnerabilidad del espermatozoide a los RL (Borkovskaya, 1997). Las células que se encuentran aquí pueden ser vulnerables a daño peroxidativo de los radicales libres por el alto contenido de ácidos grasos polinsaturados que existen en su membrana (Jong, 2008).

El aumento en GSH y TBARS es diferente para cada sistema de NP ya sean sistemas simples (SiO₂ y PECA) o los sistemas híbridos (SiO₂/PECA y PECA/SiO₂), esto puede sugerir que los sistemas híbridos producen un mayor estrés en las células de ambos órganos. Además también se pudo observar que el medio en que están suspendidas las NP produce un daño por sí mismo; esto lo podemos observar comparando el control medio P y control medio T, donde se observa que comparando con los controles control T y control P ejercen un efecto sobre las células. Además de que no existe un comportamiento dosis-respuesta consistente para cada sistema, por lo que no se puede establecer que a una dosis baja exista una menor producción de radicales libres y a una dosis alta un mayor estrés.

XI. Conclusiones

Conocimos los efectos producidos por la administración de NP a DA y DB en testículo y pulmón, esto con respecto a los parámetros estudiados (TBARS y GSH),

que se relacionan con el estrés oxidativo celular; en donde se observó que el órgano más apto para contrarrestar el efecto producido por RL en la exposición a NP de SiO₂ fue el pulmón, mientras el testículo demostró ser más susceptible a la exposición de estas NP. Por otra parte las NP de PECA ejercieron su mayor efecto en las células de pulmón, siendo que en testículo no se observó un daño elevado; los resultados anteriores se pueden atribuir a diversos factores, de entre los cuales parecen destacar las propiedades fisicoquímicas de las NP y el medio en que se encuentran suspendidas, ya que como se observó, ejercen por si mismas un efecto en los sistemas biológicos.

XII. Perspectivas del estudio

Resultaría relevante conocer los efectos tóxicos relacionados con la exposición de las NP a corto, mediano y largo plazo; además de conocer estos efectos en modelos *in vivo*, ya que hasta ahora la mayor parte de los estudios se basan en modelos *in vitro*; otro punto importante a conocer sería la respuesta que ofrecerían órganos como el cerebro y corazón; entre otros a la exposición de sistemas nanoparticulados considerando la función orgánica de los tejidos. Ya que es probable que la susceptibilidad al daño que pudieran presentar estos órganos podría presentar diferencias. El tener evidencias de los efectos tóxicos *in vitro* e *in vivo* permite conocer y abundar en el estudio de los mecanismos de acción de las nanopartículas teniendo en cuenta que sus propiedades fisicoquímicas; que son variables en función del método de obtención que se emplee para su obtención. De aquí la relevancia en desarrollar métodos de obtención de sistemas nanoparticulados y conocer las diferencias que existen entre las NP obtenidas, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*.

XIII. Anexo

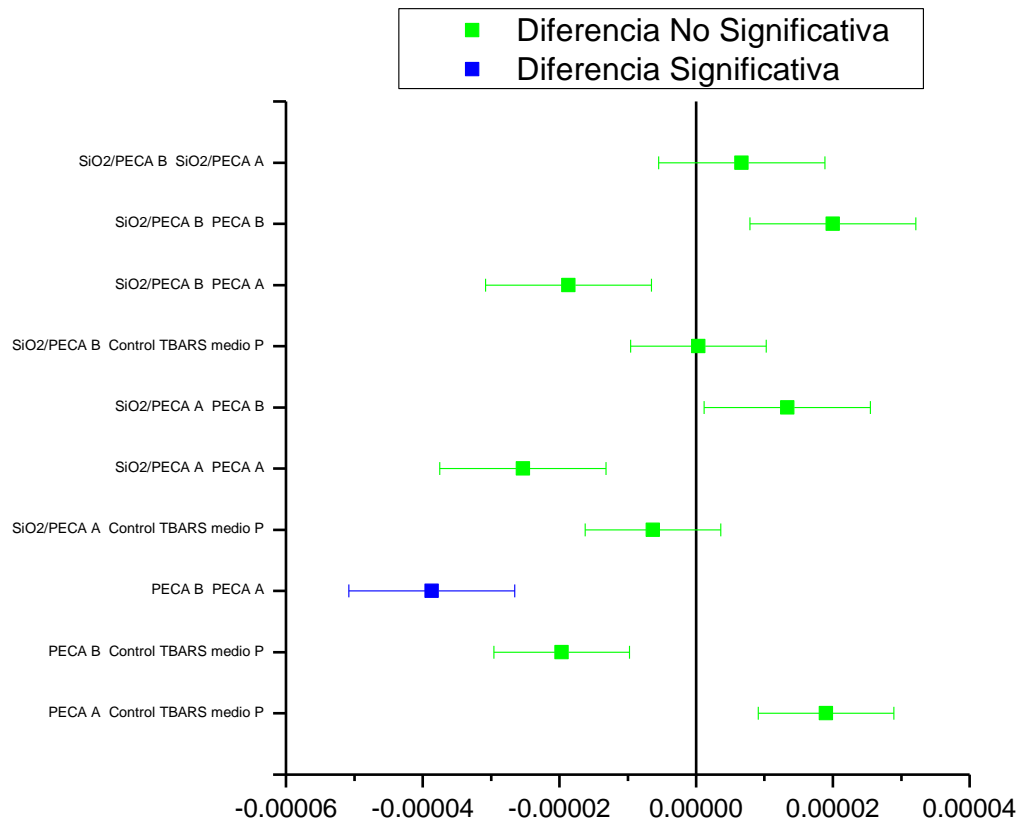


Grafico 1. Análisis múltiple de Medias de TBARS para pulmón con los sistemas de NP: PECA A, PECA B, SiO2/PECA A, SiO2/PECA B y Control TBARS Medio P utilizados.

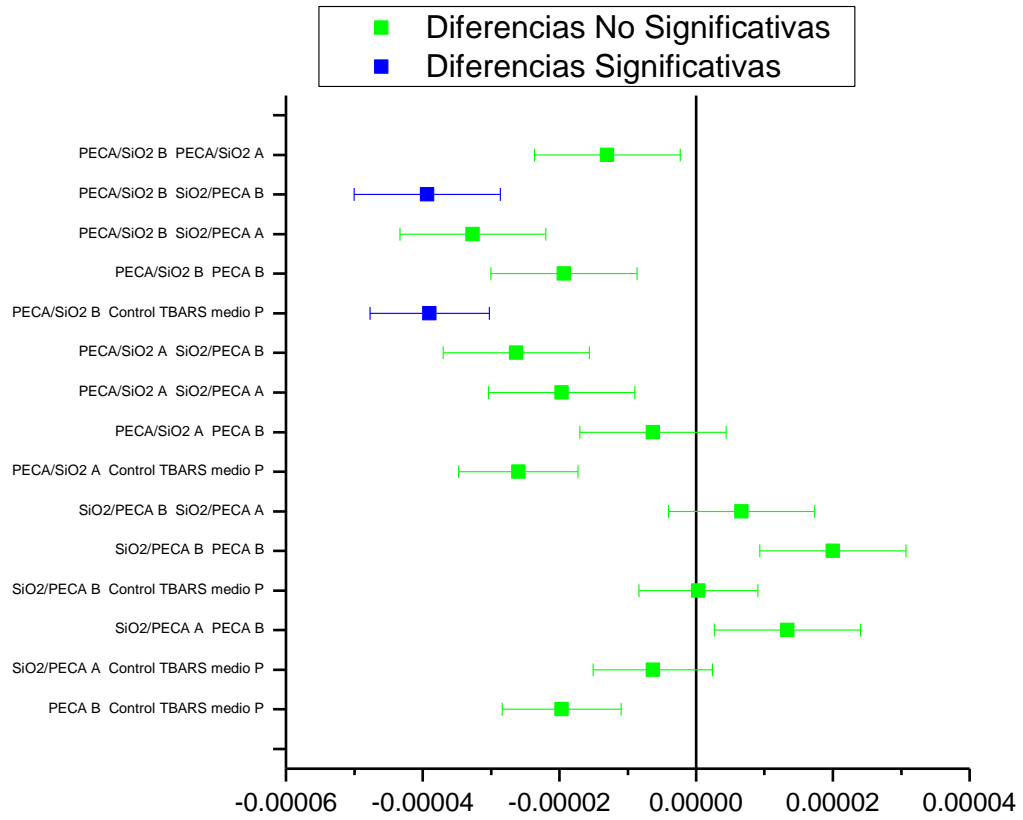


Grafico 2. Análisis múltiple de Medias de TBARS para pulmón con los sistemas de NP: SiO₂/PECA y PECA/SiO₂, PECA B y Control TBARS Medio P.

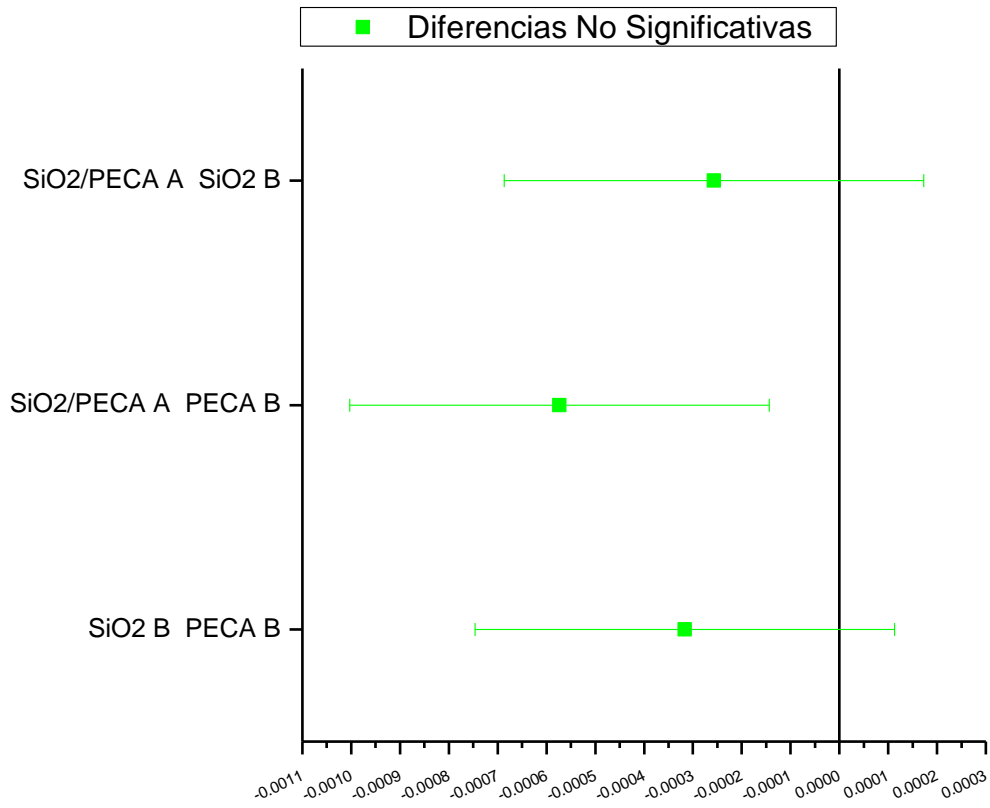


Grafico 3. Análisis múltiple de Medias de GSH para pulmón con los sistemas de NP: SiO₂/PECA A, SiO₂ B y PECA B.

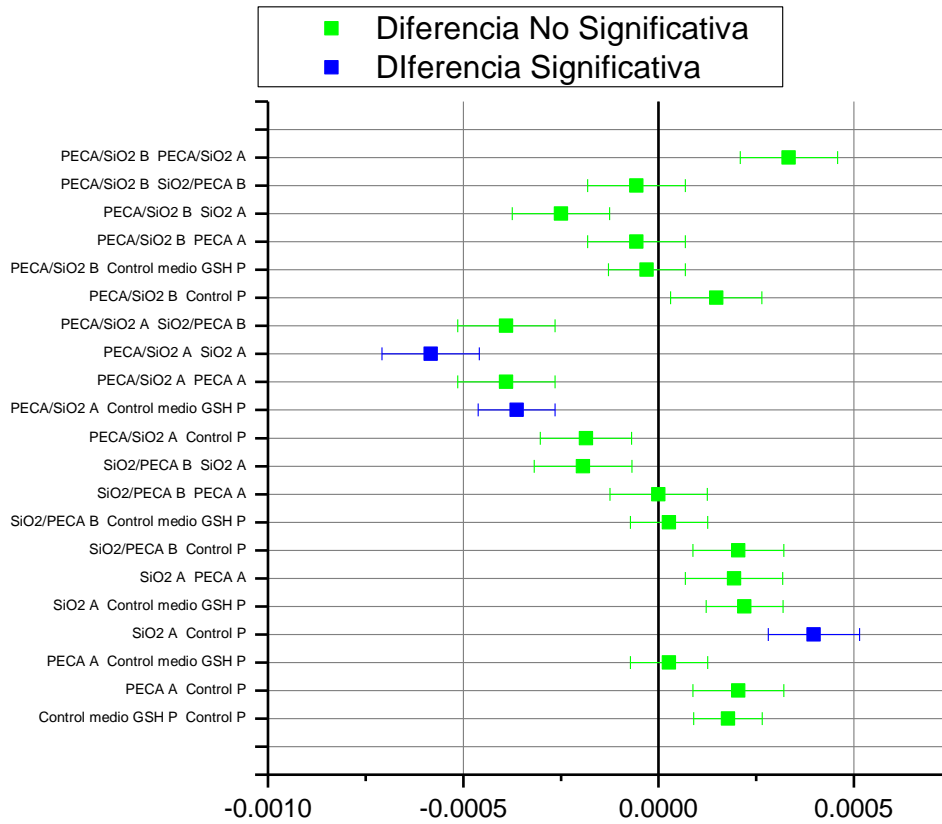


Grafico 4. Análisis múltiple de Medias de GSH para pulmón con los sistemas de NP: de PECA A y B, SiO₂ A, SiO₂/PECA B y A y PECA/SiO₂ B.

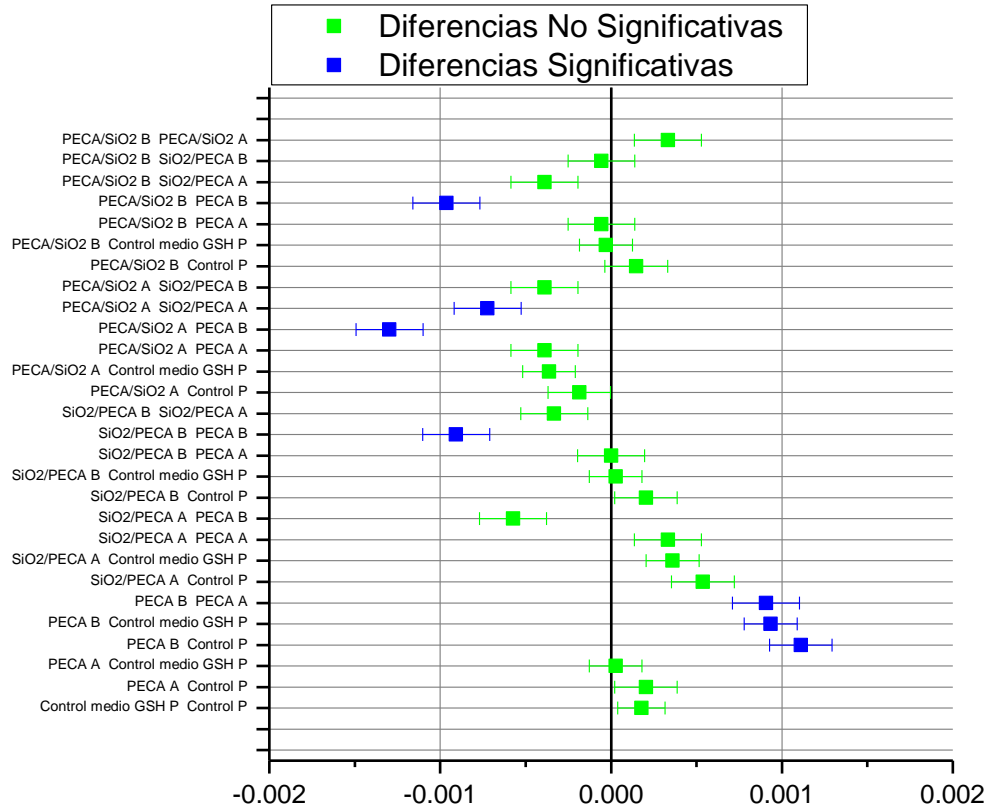


Grafico 5. Análisis múltiple de Medias de TBARS para testículo con los sistemas de NP: de PECA A y B, SiO₂/PECA B y A, PECA/SiO₂ A y B, Control T y Control TBARS Medio T.

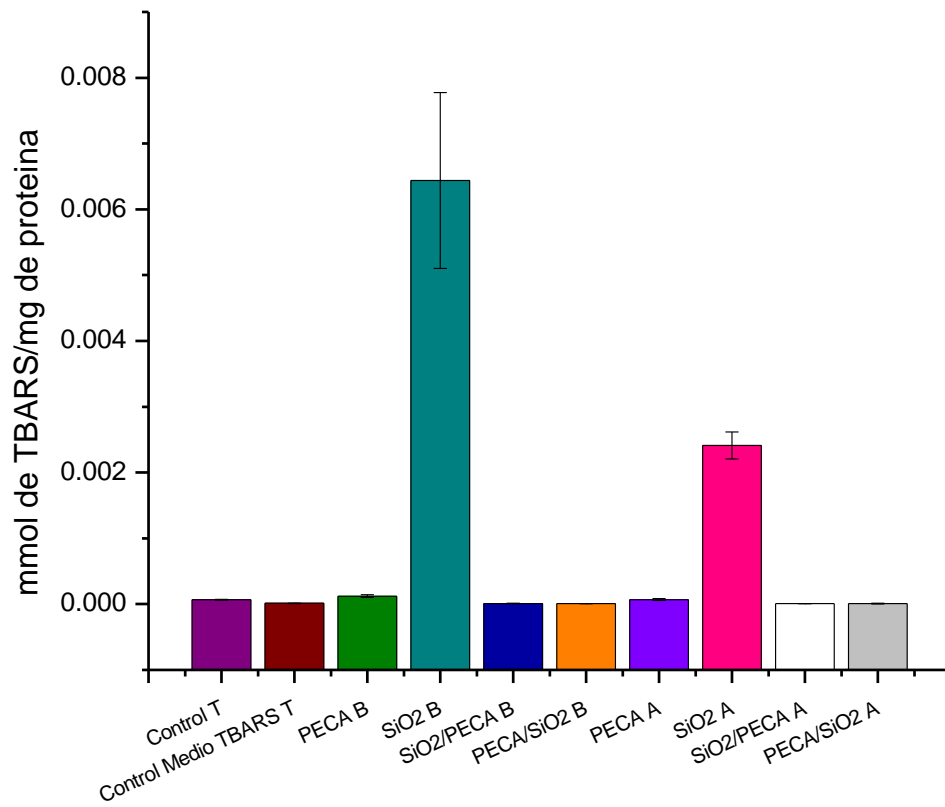


Grafico 6. Relación de mmol TBARS/ mg de Proteínas en testículo. (Donde A son las dosis altas y B son dosis bajas).

XIV. Referencias

1. Wiley, John. *Introducción a la Nanotecnología*. Barcelona, España. Editorial Reverté. (2003), p. 29.
2. Juan M. Irache, Irene Esparza, Carlos Gamazo, Maite Agüeros, Socorro Espuelas. *Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics*. *Veterinary Parasitology* 180 (2011), pp. 47– 71.
3. Hernández, Gonzalo. *Tratado de Medicina Farmacéutica*. Madrid, España. Ed. Médica Panamericana. (2010) p. 134.
4. Passagne, Isabell. *Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells*. Elsevier Ltd (2012).
5. Borkovskaya, O. Y., Dmitruk, N. L., & Fursenko, O. V. *Characterization of thin metal films with overlayers by transparency and multiangle including surface plasmon excitation reflectance ellipsometry method*. *Proceedings of SPIE* 3094. (1997), pp. 250–254.
6. Jong, W. H., & Borm, P. J. A. *Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards*. *International Journal of Nanomedicine*, 3. (2008) pp. 133–149.
7. Sweet, M. J., & Singleton, I. *Silver nanoparticles: A microbial perspective*. In *Advances in applied microbiology*. (1st Ed.). ISBN: 978-0-12-3887044-5 (Chapter 5) (2011).
8. Abhilash M. *Potential applications of Nanoparticles*. *Int J Pharm Bio Sci* 1(1), (2010).
9. Kayser, O., A. Lemke and N. Hernández-Trejo. *The Impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. (2005), p. 35.

10. Ghosh. PK *Hydrophilic polymeric nanoparticles as drug carriers*. Indian J Biochem Biophys (37) (2000), pp. 273-282.
11. Fernandez-Urrusuno.R, P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L Villa-Jato, M.J Alonso. *Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanopartilces*. Pharm. Res. 16 (1999), pp. 1576–1581.
12. Aynie I.C, C.Vauthier, E. Fattal, M. Foulquier, P. Couvreur, Alginate nanoparticles as a novel carrier for antisense oligonucleotide, in: J.E. Diederichs, R. Muler (Eds.). *Future Strategies of Drug Delivery With Particulate Systems*, Med- 405–427. Pharm Scientific Publisher, Stuttgart, (1998), pp. 5–10.
13. Shokri N, Akbari Javar H, Fouladdel Sh, Khalaj A, Khoshayand MR., Dinarvand. *Preparation and evaluation of poly (caprolactone fumurate) nanoparticles containing Doxorubicin Hcl*. DARU (19) 1, (2011).
14. Ghosh. PK *Hydrophilic polymeric nanoparticles as drug carriers*. Indian J Biochem Biophys (37), (2000), pp. 273-282.
15. Babak Kateb, Katherine Chiu, Keith L. Black, Vicky Yamamoto, Bhavraj Khalsa , Julia Y.Ljubimova. *Nanoplatforms for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: What should be the policy?* Neuro Image 54. (2011), pp. 106–124.
16. Heidi M. Mansour, MinJi Sohn, Abeer Al-Ghananeem and Patrick P. DeLuca. *Materials for pharmaceutical dosage forms: molecular pharmaceuticals and controlled release drug delivery aspects*. Int. J. Mol. Sci. (11). (2010), pp. 3298-3322.
17. J. Prasad Rao, Kurt E. Geckeler. *Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters*. Progress in Polymer Science 36 (2011) pp. 887–913.

18. Ravi Kumar MNV, Sameti M, Mohapatra SS, Kong X, Lockey RF, Bakowsky U, Lindenblatt G, Schmidt CH, Lehr M. *Cationic Silica Nanoparticles as Gene Carriers: Synthesis, Characterization and Transfection Efficiency In vitro and In vivo*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. (2004), pp. 876-881.
19. Dorota Napierska, Leen CJ Thomassen, Dominique Lison, Johan A Martens, Peter H Hoet. *The nanosilica hazard: another variable entity*. Napierska. Particle and Fibre Toxicology (2010).
20. Barik TK, Sahu B, Swain V: *Nanosilica-from medicine to pest control*. Parasitol Res. (2008), pp. 253-258.
21. C. Jia, Y. Zhou, T.Q. Lei, J. Eur. Ceram. Soc. 23 (2003) pp. 801–808.
22. A.P. Legrand. *The Surface Properties of Silicas*. Ed. Wiley, NewYork (1998).
23. Kolbe, G. *The complex Chemical Behaviour of Silica*. Dissertation, Jena, Alemania. (1956).
24. Adams, L.K., Lyon, D.Y., Alvarez, P.J. *Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions*. Water Res. 40. (2006) pp. 3527–3532.
25. Fent, K., Weisbrod, C.J., Wirth-Heller, A., Pieles, U. *Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish (Danio rerio) early life stages*. Aquat.Toxicol. (2010), pp. 218–228.
26. Hoecke, K.V., De Schamphelaere, K.A.C., der Meeren, P.V., Lucas, S., Janssen, C.R. *Ecotoxicity of silica nanoparticles to the green alga Pseudokirchneriella subcapitata: importance of surface area*. Environ. Toxicol. Chem. 27. (2008), pp. 1948–1957.
27. Liu, T., Li, L., Teng, X., Huang, X., Liu, H., Chen, D., Ren, J., He, J., Tang, F. *Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice*. Biomaterials. (2011), pp. 1657–1668.

28. Lu, X., Tian, Y., Zhao, Q., Jin, T., Xiao, S., Fan, X. *Integrated metabonomics analysis of the size-response relationship of silica nanoparticles-induced toxicity in mice*. *Nanotechnology* 22, (2011), p.16.
29. Nel, A., Xia, T., Madler, L., Lin, N. *Toxic potential of materials at the nano level*. *Science* 311. (2006), pp. 622–627.
30. Kolbe, G. *The complex Chemical Behaviour of Silic*. Dissertation, Jena, Alemania. (1956).
31. Ahamed, M. *Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells*. *Toxicol. In Vitro* 25. (2011), pp. 930–936.
32. Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S., Schlager, J., Hong, Y. *DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233. (2008), pp. 404–410.
33. Ardis AE. *Preparation of monomeric alkyl a-cyanoacrylates*. US Patent 2,467,926; (1949).
34. Vauthier C, Dubernet C, Fattal E, Pinto-Alphandary H, Couvreur P. *Poly (alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications*. *Adv Drug Deliv Rev.* 55. (2003), pp. 519–48.
35. Exline DL, Wallace C, Roux C, Lennard C, Nelson MP, Treado PJ. *Forensic applications of chemical imaging: latent fingerprint detection using visible absorption and luminescence*. *J Forensic Sci.* 48. (2003), pp. 1047–53.
36. Domb, AJ. *Poly (alkylcyanoacrylates) DM Wiseman*. *Handbook of biodegradable polymers*, Harwood, Amsterdam. (1997), pp. 183-202.
37. Fattal, E. AJ Domb, J Kost, DM Wiseman. *Poly (alkylcyanoacrylates)*. *Handbook of Biodegradable Polymers*, Harwood, Amsterdam. (1997), pp 183-202.

38. Isabelle Passagne, Marie Morille, Marine Rousset, Igor Pujalté, Béatrice L'Azou. *Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells*. *Toxicology* 299. (2012), pp. 112– 124.
39. Seong-Dae Oh, Seungho Lee. *Synthesis of Ag and Ag–SiO₂ nanoparticles by gamma -irradiation and their antibacterial and antifungal efficiency against Salmonella enterica serovar Typhimurium and Botrytis cinerea*. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 275. (2006), pp. 228–233.
40. Zhang, F. *Simultaneous assay of glucose, lactate, L-glutamate and hypoxanthine levels in a rat striatum using enzyme electrodes based on neutral red-doped silica nanoparticles*. *Anal Bioanal Chem.* (2004), pp. 637-42.
41. Kaewamatawong, T. *Acute pulmonary toxicity caused by exposure to colloidal silica: particle size dependent pathological changes in mice*. *Toxicol Pathol* 33. (2005), pp.743-9.
42. H. Oowaki, S. Matsuda, N. Sakai, T. Ohta, H. Iwata, A. Sadato, W. Taki, N. Hashimoto, Y. Ikada, *Non-adhesive cyanoacrylate as an embolic material for endovascular neurosurgery*. *Biomaterials* 2.1 (2000), pp. 1039–1046.
43. AR Williams. *Colloid and Surface Engineering: Applications in the process industries*. Butterworth-Heinemann, Oxford Magnetic technology (Ed.). (1994), pp. 248-286
44. Mckay, RB. *Dispersions as pharmaceutical dosage forms*. (Ed.), Technological Applications of Dispersions, Marcel Dekker, New York (1994), pp. 457-497.
45. Alexandra P. Kafka, Bernie J. McLeod, Thomas Rades, Arlene McDowell. *Release and bioactivity of PACA nanoparticles containing D-Lys6-GnRH for brushtail possum fertility control*. *Journal of Controlled Release* 149. (2011), pp. 307–313.

46. Cavallaro, G. *The β -lactams trapping polyethylcyanoacrylate antibiotic nanoparticles: studies on the possible in vivo application of this colloidal delivery system.* Int J. Pharm. 111. (1994), pp. 31-41.
47. Decout, A. *Release mechanism of doxorubicin polymer particles: a limited interfacial transfer process affected by serum proteins.* J. Colloid Interf. Science., 181. (1996), pp. 99-107.
48. Verena Christen a, Karl Fent. *Silica nanoparticles and silver-doped silica nanoparticles induce endoplasmatic reticulum stress response and alter cytochrome P4501A activity.* Chemosphere 87. (2012), pp. 423–434.
49. Citlali García-Saucedo, James A. Field, Lila Otero González, Reyes Sierra-Álvarez. *Low toxicity of HfO₂, SiO₂, Al₂O₃ and CeO₂ nanoparticles to the yeast, Saccharomyces cerevisiae.* Journal of Hazardous Materials 192. (2011), pp. 1572– 1579.
50. M. Rousset, I. Pujalté, M. Morille, C. Apolit, B. L'Azou, I. Passagne. *Assessment of uptake and toxicity of silica (SiO₂) nanoparticles.* Abstracts / Toxicology Letters 205. (2011), pp. 60–S179.
51. Kyung O. Yu, Christin M. Grabinski, Amanda M. Schrand, Richard C. Murdock, Wei Wang, Baohua Gu, John J. Schlager, Saber M. Hussain. *Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes.* Journal of Nanoparticle Research. Volume 11. (2009), pp. 15-24.
52. Kaewamatawong, T. *Acute pulmonary toxicity caused by exposure to colloidal silica: particle size dependent pathological changes in mice.* Toxicol Pathol 33. (2005), pp. 743-9.
53. Chen, Y. *Comparing study of the effect of nanosized silicon dioxide and microsized silicon dioxide on fibrogenesis in rats.* Toxicol Ind Health 20. (2004), pp. 21-7.

54. AC de Verdiere, C Dubernet, F Nemati, E Soma, M Appel, J Ferte, S Bernard, F Puisieux, P Couvreur. *Reversion of multidrug resistance with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: towards a mechanism of action*. British Journal of Cancer 76. (1997), pp. 198-205.
55. Jinghua Duana, 1, Yangde Zhanga, 1, Shiwei Hana, Yuxiang Chena, Bo Lib, Mingmei Liaoa, Wei Chena. *Synthesis and in vitro/in vivo anti-cancer evaluation of curcumin-loaded chitosan/poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles*. Pharmaceutical Nanotechnology. Volume 400. (2010), pp. 211–220.
56. Zheng , M. Zheng, S. Ekmekcioglu, E.T. Walch, C.H. Tang, E.A. Grimm. *Inhibition of nuclear factor-kappaB and nitric oxide by curcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells Melanoma. Res.*, 14 (2004), pp. 165–171.
57. J. Choi, P. Zheng, HRSE Katz, TR Guilarte. *A silica-based nanoparticles uptake and cellular response through primary microglia. Environment. Health Perspectives* 118. (2010), pp. 589-595.
58. Meng HRS, T. Xia, S. George, AE Nel. *A prediction model for assessing toxicological safety of nanomaterials*. Journal ACS Nano, three (2009), pp. 1620-1627.
59. F. Wang, F. Gao, M. Lan, HRS Yuan, Y. Huang, J. Liu. *Oxidative stress contributes to silica nanoparticles induced cytotoxicity in embryonic kidney cells*. Toxicol. In Vitro, 23. (2009), pp. 808-815.
60. Chiara Uboldi, Guido Giudetti, Francesca Broggi, Douglas Gilliland, Jessica Ponti, Francis Rossi. *Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts*. Mutation Research 745. (2012), pp. 11– 20.
61. Thomas R. Downs, Meredith E. Crosby, Ting Hu, Shyam Kumar, Ashley Sullivan, Katherine Sarlo, Bob Reeder, Matt Lynch, Matthew Wagner. *Silica*

nanoparticles administered at the maximum tolerated dose induce genotoxic effects through an inflammatory reaction while gold nanoparticles do not. Mutation Research 745. (2012), pp. 38– 50.

62. Jedd M. Hillegass, Arti Shukla, Sherrill A. Lathrop, Maximilian B. MacPherson, Naomi K. Fukagawa and Brooke T. Mossman. *Assessing nanotoxicity in cells in vitro.* Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. (2010), pp. 219–231.

63. Christine Vauthier, Catherine Dubernet, Elias Fattal, Huguette Pinto-Alphandary, Patrick Couvreur. *Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications.* Advanced Drug Delivery Reviews 55. (2003), pp. 519–548.

64. Lherm, C. *Alkylcyanoacrylates drug carriers: II. Cytotoxicity cyanoacrylate nanoparticles with different alkyl chain length.* Int J. Pharm. 84. (1992), pp. 13-22.

65. Zhen Chen, Huan Meng, Gengmei Xing, Hui Yuan, Feng Zhao, Ru Liu, Xuelin Chang . *Age-Related Differences in Pulmonary and Cardiovascular Responses to SiO₂ Nanoparticle Inhalation: Nanotoxicity Has Susceptible Population.* Environ. Sci. Technol 42. (2008), pp. 8985–8992.

66. Javed Ahmad, Maqsood Ahamed, Mohd Javed Akhtar, Salman A. Alrokayan, Maqsood A. Siddiqui, Javed Musarrat, Abdulaziz A. Al-Khedhairi. *Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2.* Toxicology and Applied Pharmacology 259. (2012), pp. 160–168.

67. S.H. Doak, B. Manshian, G.J.S. Jenkins, N. Singh. *In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines.* Mutation Research 745. (2012), pp. 104– 111.

68. Collins, A. R. *The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations.* Molecular Biotechnology 26. (2004), pp. 249-26.

69. Mitchelmore, C.L. y J. K. Chipman. *DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring*. Mutation Research 399. (1998), pp. 135-147.
70. Avishai, N., C. Rabinowitz, E. Moiseeva y B. Rinkevich. *Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay*. Mutation Research 518 (2002), pp. 21-37.
71. Cotelle, S. y J. F. Férard. *Comet assay in genetic ecotoxicology: a review*. Environmental and Molecular Mutagenesis 34. (1999), pp. 246-255.
72. Nollet, Leo. *Handbook Of Muscle Foods Analysis*. Taylor & Francis Group. United States of America. 949 pp.
73. Timothy M. Potter, Barry W. Neun, and Stephan T. Stern. *Assay to Detect Lipid Peroxidation upon Exposure to Nanoparticles. Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. Methods in Molecular Biology, vol. 697. (2011), pp 181-189
74. Anderson, M E. *Glutathione and glutathione delivery compounds*. Adv Pjarmacol 38. (1997), pp. 65-78.
75. Jedd M. Hillegass, Arti Shukla, Sherrill A. Lathrop, Maximilian B. MacPherson, Naomi K. Fukagawa and Brooke T. Mossman. *Assessing nanotoxicity in cells in vitro*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. (2010), pp. 219–231.
76. Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC. *Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult?*. Mutat Res 428. (1999), pp. 17-22.
77. Sánchez-Rodríguez M, Santiago-Osorio E, Vargas LA, Mendoza-Nuñez VM. *Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo*. Bioquímica 29. (2004), pp. 81-90.

78. Rodríguez Perón JM, Menéndez López JR, Trujillo López Y. *Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo*. Rev Cubana Med Milit 30. (2001), pp. 36-44.
79. Dorado Martínez C, Rugerio Vargas C, Rivas Arancibia S. *Estrés oxidativo y neurodegeneración*. Rev Fac Med UNAM 46, (2003), pp. 229-235.
80. Schmid W. *The micronucleus test*. Mutat Res 31. (1975), pp. 9-15.
81. María Luisa Ramos Ibarra, Cecilia Margarita Batista González, Belinda Claudia Gómez Meda, Ana Lourdes Zamora Pérez. *Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes*. Investigación en Salud, abril, año/vol. VIII, número 001. Universidad de Guadalajara Guadalajara, México. pp. 7-15
82. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. *Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases*. Biol Chem 390. (2009), pp. 191-214.
83. Franco R, Cidlowski JA. *Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant*. Cell Death Differ 16. (2009), pp. 1303-1314.
84. McEligot AJ, Yang S, Meyskens FL. *Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells*. Annu Rev Nutr 25. (2005), pp. 261-295.
85. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. *Glutathione metabolism in brain, metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species*. Eur J Biochem 267. (2000), pp. 4912-4916.
86. Badui, Salvador. *Química de los alimentos*. Alhambra Mexicana. 3ª edición. Estado de México, México. (1999). 271 pp.
87. I. M. Vicario Romero, R. Guillén Sans, M. Guzmán Chozas. *Utilización del ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (ATB) para evaluar el proceso autooxidativo en alimentos*. Grasas y Aceites. Vol 48 Fasc. 2, (1997), pp. 96-102.

88. <http://es.scribd.com/doc/25509287/31/II-6-6-4-Indice-del-acido-tiobarbiturico-ATB> (19:34) [01-09-2012]
89. Martínez Jesús, Torres Patricia Victoria, Juárez Marco Antonio. *El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral*. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. REB 30(2). (2011), pp. 56-67.
90. Kaewamatawong, T. *Acute pulmonary toxicity caused by exposure to colloidal silica: particle size dependent pathological changes in mice*. Toxicol Pathol 33. (2005), pp. 743-9.