



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**

**Efecto de la alimentación de dióxido de titanio grado alimenticio (E171) en órganos del desarrollo espermático y proteínas testiculares asociadas a barrera hematotesticular e inflamación**

**TESIS**

**Que para obtener el título de Lic. en Bioquímica Diagnóstica**

**Presenta:**

**Juan Carlos Rodríguez Escamilla**

**Asesora:**

**Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro**

**CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Efecto de la alimentación de dióxido de titanio grado alimenticio (E171) en órganos del desarrollo espermático y proteínas testiculares asociadas a barrera hematotesticular e inflamación**

Que presenta el pasante: Juan Carlos Rodríguez Escamilla  
Con número de cuenta: 308280506 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a de de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	
<b>VOCAL</b>	Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro	
<b>SECRETARIO</b>	QFB. Daniel Raygoza Trejo	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dra. Dolores Molina Jasso	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en E. María Verónica Vázquez Cianca	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, por enseñarme a ser la persona que soy actualmente, quienes con una gran madurez y amor combinados han logrado concebir una familia maravillosa. Me han enseñado a ser parte de una familia grande y de grandes sentimientos entre todos, a cada uno de mi familia, los aprecio y amo.

A Susana; por ser realmente la mejor madre que pude haber pedido, el más grande motor de mi vida, gracias por la vida y el incondicional amor. La persona más importante de mi vida eres tú, que suerte por hacerme a tu forma y estar siempre presente, toda mi seguridad ha nacido de ti y ahora quiero regresar todo lo que he recibido de tu parte. Te amo Ma

A José; por ser infaltable y ser quien se mantiene estricto por el bien de la familia. Gracias por enseñarme a tomar decisiones ante las situaciones más complicadas de la vida y demostrarme siempre cuán importante soy para ti. Te amo Pa

Gracias a quienes han vivido conmigo esta parte maravillosa de mi vida, mis hermanos y familia, por su amor incondicional, motivación y apoyo. Es lo que me da fuerza, saber que están conmigo en cualquier parte y quiero pasar los mejores momentos junto a ustedes.

A Abigail, Aby mi hermana adorada, la primera amiga que tuve y que desde entonces siempre lo ha sido, escuchándome, apoyándome... siempre al pie del cañon y llena de amor.

A Pepe mi hermano y mi mayor admiración, mi compañero de juegos y mi mejor consejero, la persona más inteligente que conozco, si estoy donde estoy es por ti hermano.

A Itzel mi hermanita y amiga, tu existencia es la mejor noticia que he recibido en la vida, desde el principio he procurado cuidar de ti y estar presente como siempre lo han estado nuestros hermanos, amo los momentos de diversión y aprendizaje

Emiliano mi casi hermano, Nicolas, Maria Jose y Aby Valentina, verlos crecer es motivante quiero ser una persona de la que ustedes se sientan orgullosos.

A cada uno de mis tíos: Luis, Lalo, Pablo, Joel, Juan, Pancho, Rogelio, Gil, Tere, Cori, Marta, Sara y a mis primos Roge, Pablo, Ale, Beto, Brenda, Viris, Luis, Oscar, Cesar, Valdo, que siempre han entendido mi perspectiva pues siempre hemos estado al pendiente de estar viviendo la vida lo mejor posible, con quienes me sigo divirtiendo y aprendiendo.

A mi directora de tesis la Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro, quien me ha enseñado día con día a ser mejor persona, quien ha visto profundamente en mí y ha sabido enseñarme a sobreponerme a muchísimas situaciones, quien además de ser mi mentora es mi amiga, no terminaré de agradecerle por permitirme concluir mi vida académica.

A la jefa del laboratorio de nanotoxicología y carcinogénesis la Dra. Yolanda Irasema Chirino López, quien ha sido una admiración y ejemplo desde el primer momento en que me recibió en su laboratorio.

A mis amigos de CCH y de la carrera, que me han encaminado hasta este punto en mi vida universitaria. A mis compañeros del laboratorio 10 de la UBIMED, Ingrid, Carolina, Octavio, Alex, Zagal, Natalia y Anita quienes hacen amenos los ratos haciendo ciencia. Y por supuesto a la UNAM mi máximo orgullo, la máxima casa de estudios y literal mi segunda casa.

El proyecto fue apoyado por el Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación (PAPCA, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM; FESI-DIP-PAPCA-2016-11). Las imágenes de microscopia confocal fueron obtenidas con un Microscopio confocal Leica SP8 obtenido por el proyecto (CONACyT 268769). Gracias al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT, UNAM) para la caracterización del E171.

Gracias a cada persona a la que aburrí durante muchísimo tiempo con el mismo tema y a aquellos que siempre estuvieron al tanto. Gracias por su comprensión, palabras de apoyo, pero también la presión y firmeza que me ha hecho falta.

## DEDICATORIA

Este trabajo se realizó en la época más memorable de mi vida, la cúspide de toda una etapa increíble de universidad, coincidiendo con una etapa de cambio social en México que ha generado tantas opiniones y predicciones, que solo el tiempo le dará la razón a cada uno. De abuelo espero contar con alegría que nosotros teníamos la esperanza de que realmente cambiara y eso traería momentos de mejor transformación social. Ha sido un placer descubrir que tan mexicano me siento teniendo perspectiva a partir de tan diversos escenarios y ambientes que cada uno de mis conocidos ofreció a la experiencia de mi vida.

A todas y cada una de las personas que siempre están en mi mente, manteniendo mi mente dirigida hacia adelante...por su mera existencia y hacerme buscar más interacciones con mejor calidad de vida. La motivación que ustedes me han brindado en este largo camino me ha hecho la persona que soy, esta experiencia es dedicada a todos ustedes.

Todo el proceso fue realizado

Junto a una amada familia.

Con una vida llena de amistad en sus muy diferentes formas

Y permitiéndome distinguir prioridades verdaderas, que van más allá del tiempo académico

Vivir rodeado de amor, amistad y tranquilidad sobrepasa cualquier exigencia no digna

No existe amor más grande que el de mis padres, el que haya permanecido toda la vida, en cada uno de los escenarios que mi vida, enseñándome la forma de aprender de cada experiencia me ha hecho empático. Empatía suave y cariñosa como mí madre, empatía firme y realista como la de mi padre, polos complementarios que me hacen ver la vida de manera adecuada. La vida alegre que mueve mis acciones es gracias a ellos, ellos que me enseñaron a hacer sonreír a otros sonriendo, a continuar creciendo en esta actualidad y saber qué tipo de vida quiero. Nunca me falten, de aquí a que mis últimas neuronas hagan conexión siempre serán mi guía para volver a un camino mejor y seguro, afrontar cualquier problema y valorar la familia como mi mayor tesoro.

A mi tía Gloria, a mi Abuelita Julia, mi abuelito José y mi abuelito Juan, que en paz descansen. A cada uno de mis amigos. Han sido mis maestros de la vida, por compartir su confianza brindada y cada una de sus palabras, alegrías, obstáculos, celebraciones, charlas, abrazos, comidas, juegos e infinidad de experiencias con contrastes tan variados como sus personalidades.

A Gaby por permitirme sentir amor de esta manera tan única, celebro de tú mano infaltable en todas y cada una de las experiencias vividas. Tú eres quien siempre me ha correspondido confiando absolutamente en lo que ambos vimos en cada uno desde ese primer instante que nos unió, soy feliz contigo acompañándome en la cúspide de mi vida. Te amo.

## RESUMEN

El dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) grado alimenticio compone el aditivo E171, ocupado en productos farmacéuticos, de uso diario y alimenticios. En México la regulación de E171 se basa en las buenas prácticas de manufactura, que permiten ocupar la cantidad necesaria hasta lograr el color deseado. Mientras que en productos importados de EU se establece un límite máximo de 1% del peso del alimento. En el E171 se pueden encontrar porcentajes desde 12% hasta más de 50% de nanopartículas. Las partículas de E171 pueden llegar a circulación sanguínea o linfática, intracelularmente pueden generar estrés oxidativo e inducir la producción de componentes proinflamatorios, efectos toxicológicos que se pueden determinar mediante una evaluación histológica. El efecto del E171 en órganos reproductivos es importante para la re-evaluación de este aditivo por la EFSA, organismo encargado en evaluar información para la regulación de productos alimenticios en Europa. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto a nivel histológico en testículos y epidídimos de ratones BALB/c, después de la alimentación con cantidades de 0.1%, 0.5% y 1% de E171 del peso total del alimento en el pellet durante siete semanas, respecto a los alimentados sin E171. El peso semanal de los animales y el peso de los órganos no cambio de manera significativa en los ratones tratados. Sin embargo en cortes transversales de testículo los resultados histológicos mostraron alteraciones, tales como desprendimiento del epitelio germinal en todos los tratamientos y descamación de las células germinales en los ratones alimentados con cantidades de E171 al 1%. Se observó el engrosamiento del parénquima con aumento de células con 1% de E171, por lo que se evaluó la expresión de MHC II de las células inmunes y marcador de inflamación cuando es expresado por otras células que no sean estas células. Se detectó una mayor presencia de MHC II con alimentación de E171 al 0.5% y 1%. También se evaluó la integridad de la BHT mediante la determinación en la expresión de N-cadherina y colágeno, reguladores celulares de esta barrera. Confirmando la disminución en la expresión de N-cadherina y colágeno en todos los grupos alimentados con E171, junto con la disminución en la concentración de hidroxiprolina asociada a la síntesis de colágeno a 0.5% y 1% de E171. En los ratones con dieta de E171 al 0.5% y 1% se observa de manera generalizada en la zona caput del epidídimo un aumento de vacuolizaciones y desorganización del epitelio, mientras que en la zona cauda hay disminución de las interacciones entre el epitelio y espermatozoides. En conclusión, se presentaron alteraciones histológicas en testículo y epidídimo de ratones con dieta de E171 principalmente con 1% de E171, así como una disminución en la expresión de colágeno I y N-cadherina en todos los grupos alimentados con E171. El aumento en la expresión de MHC II en testículos, confirma un proceso inflamatorio en ratones con dieta de 0.5% y 1% de E171. El daño en órganos del desarrollo espermático como efecto de la alimentación con E171 podría afectar la calidad en la formación espermática.

### Palabras clave

Dióxido de titanio grado alimenticio, E171, testículo, epidídimo, barrera hematotesticular, MHC II.

## ABREVIATURAS

<b>AJ</b>	Del inglés Adherens Junctions: Uniones Adherentes
<b>BHT</b>	Barrera Hematotesticular
<b>BPM</b>	Buenas Prácticas de Manufacturación
<b>BSA</b>	Del inglés Bovine Serum Albumine: Suero Fetal Bovino
<b>CS</b>	Células de sertoli
<b>CG</b>	Células germinales
<b>DOD</b>	Del inglés Departament of Defense: Departamento de Defensa
<b>E171</b>	Número Europeo de identificación para el Dióxido de Titanio como aditivo
<b>EE</b>	Especializaciones Ectoplásmicas
<b>EFSA</b>	Del inglés European Food Safety Authority: Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea
<b>EPA</b>	Del inglés Enviromental Protection Agency Agencia de Protección Ambiental
<b>FDA</b>	Del inglés Food and Drug Administration: Administración de Alimentos y Fármacos
<b>GI</b>	Gastrointestinal
<b>IARC</b>	Del inglés International Agency for Research on Cancer: Agencia Internacional para la Investigación del Cancer
<b>IG</b>	Intragástrica
<b>MHC II</b>	Del inglés Major Histocompatibility Complex II: Complejo Mayor de histocompatibilidad II
<b>NIH</b>	Del inglés National Institute of Health Instituto nacional de Salud
<b>NIOSH</b>	Del inglés National Institute of Occupational Safety and Health: Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>NMM</b>	Del inglés Nanomaterial Manufactured: Nanomaterial Nanomaterial manufacturado
<b>NNI</b>	Del inglés National Nanotechnology Initiative: Iniciativa Nacional de Nanotecnología
<b>NOAEL</b>	Del inglés No Observable Adverse Effects Level: Nivel de Efectos Adversos no Observables
<b>NP</b>	Nanopartícula
<b>NTP</b>	Del inglés National Toxicology Project: Proyecto Nacional de Toxicología
<b>PBS</b>	Del inglés Phospates Buffer Solution: Solución Buffer de Fosfatos
<b>pH</b>	$-\log [H^+]$
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Titanio
<b>TJ</b>	Del inglés Tight junctions: Uniones Estrechas
<b>TLR</b>	Del inglés Toll Like Receptor: Receptor Tipo Toll
<b>TS</b>	Túbulos seminíferos
<b>Sc</b>	Espermatocitos
<b>Sd</b>	Espermátides
<b>SEM</b>	Del inglés Scanning Electron Microscopy: Microscopía Electrónica de Barrido
<b>Sg</b>	Espermatogónias



# ÍNDICE

## 1- INTRODUCCIÓN

- 1.1- Características de los nanomateriales manufacturados (NMM) grado alimenticio para evaluar su uso seguro en humanos.
- 1.2- Propiedades generales fisicoquímicas (FQ) y morfológicas de los NMM en nanotoxicología
- 1.3- TiO<sub>2</sub> grado alimenticio o E171: empleo, regulación y exposición alimenticia
- 1.4- Distribución y efectos adversos del TiO<sub>2</sub>
  - 1.4.1.- Distribución y efectos adversos del E171
- 1.5- Anatomía e histología del testículo
  - 1.5.1- Desarrollo espermático en epitelio germinal: papel de la barrera hematotesticular y su evaluación toxicológica
- 1.6- Anatomía e histología de epidídimo
- 1.7- Efectos de NP de dióxido de titanio en órganos del desarrollo espermático

## 2- JUSTIFICACIÓN

## 3- HIPÓTESIS

## 4- OBJETIVOS

- 4.1-Objetivo general
- 4.2-Objetivos particulares

## 5- MATERIALES Y MÉTODOS

- 5.1- Preparación de alimento de ratón con E171 y medición de dureza
- 5.2- Caracterización de tamaño y morfológica de E171.
- 5.3- Caracterización de alimento con E171 disperso en flúidos gastrointestinales simulados
- 5.4- Condiciones y comportamiento de los ratones tratados con E171
  - 5.4.1-Modelo experimental dieta de alimento con E171
- 5.5- Procesamiento histológico
  - 5.5.1- Histoquímica con tinción Hematoxilina y Eosina (H&E) a cortes transversales de testículo.
  - 5.5.2- Histoquímica con tinción Tricrómica de Masson (TM)
- 5.6- Evaluación histológica mediante cuantificación de alteraciones tisulares en túbulos seminíferos
- 5.7- Evaluación de proceso inflamatorio por detección de la expresión de MHC-II
- 5.8- Integridad de barrera hematotesticular al evaluar la expresión de N-cadherina y colágeno I
- 5.9- Cuantificación de hidroxiprolina asociada a síntesis de colágeno

## 6- RESULTADOS

- 6.1- Apariencia del alimento sin y con E171
- 6.2. Valoración de la dureza de pellets sin y con E171
- 6.3- Caracterización del tamaño y forma del polvo seco de E171 mediante microscopia electrónica de barrido
- 6.4- Caracterización del alimento sin y con E171 en flúidos gastrointestinales simulados
- 6.5- Valoración del consumo semanal del consumo de alimento durante el tratamiento
- 6.6- Monitoreo semanal de los pesos de animales alimentados con E171
- 6.7- Estimación de dosis semanal consumida durante el estudio
- 6.8- Evaluación del peso de órganos
- 6.9- Desprendimiento de epitelio germinal como efecto de la alimentación con E171
- 6.10- Descamación de células germinales como efecto de altas cantidades de E171
- 6.11- Evaluación de la distribución del parénquima testicular
- 6.12- Evaluación de proceso inflamatorio al detectar la expresión de MHC-II en tejido testicular
- 6.13- Integridad de BHT evidenciada por la expresión de N-cadherina
- 6.14- Disminución en la expresión de colágeno I y en la concentración de hidroxiprolina como efecto de la alimentación con E171
- 6.15- Valoración histológica del epitelio de zona caput de epidídimo
- 6.16- Valoración de la interacción entre espermatozoides y epitelio de zona cauda de epidídimo

## 7- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

## 8- CONCLUSIONES

## 9- REFERENCIAS

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Propiedades fisicoquímicas y morfológicas de las nanopartículas en medio líquido
2. Factores que determinan la agregación; evaluación de la distribución del tamaño de partículas en medio intestinal simulado
3. Productos que contienen E171 e instituciones implicadas en su regulación
4. Algunos órganos con barrera hematotisular
5. Distribución de E171 a sangre, hígado y bazo después de su administración oral
6. Anatomía e histología de testículos
7. Epitelio germinal, barrera hematotesticular y proceso de espermatogénesis
8. Anatomía e histología de epidídimo
9. Alteraciones histológicas testiculares por compuestos tóxicos
10. Esquema del modelo experimental de alimento con E171
11. Tamaño, forma y color de alimento preparado sin y con E171
12. Microscopia electrónica de barrido de E171 evaluando tamaño y forma en su forma seca
13. Determinación de la distribución de tamaños de agregados en fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS)
14. Determinación y cuantificación del desprendimiento del epitelio germinal de túbulos seminíferos
15. Determinación y cuantificación de la descamación de células germinales de descamación del epitelio germinal
16. Valoración del aumento en el grosor del parénquima y cantidad de células
17. Inmunodetección y cuantificación de la expresión de MHC II en cortes histológicos de testículo
18. Inmunodetección y cuantificación de la expresión de N-cadherina en túbulos seminíferos
19. Inmunodetección y cuantificación de la expresión de colágeno I e hidroxiprolina en testículo
20. Valoración histológica del epitelio de zona caput de epidídimo
21. Valoración de la interacción entre espermatozoides y epitelio de zona cauda de epidídimo

## **ÍNDICE DE TABLAS**

1. Resumen de estudios de los efectos del dióxido de titanio en testículos de roedores
2. Tabla de cuantificación de alteraciones histológicas en TS

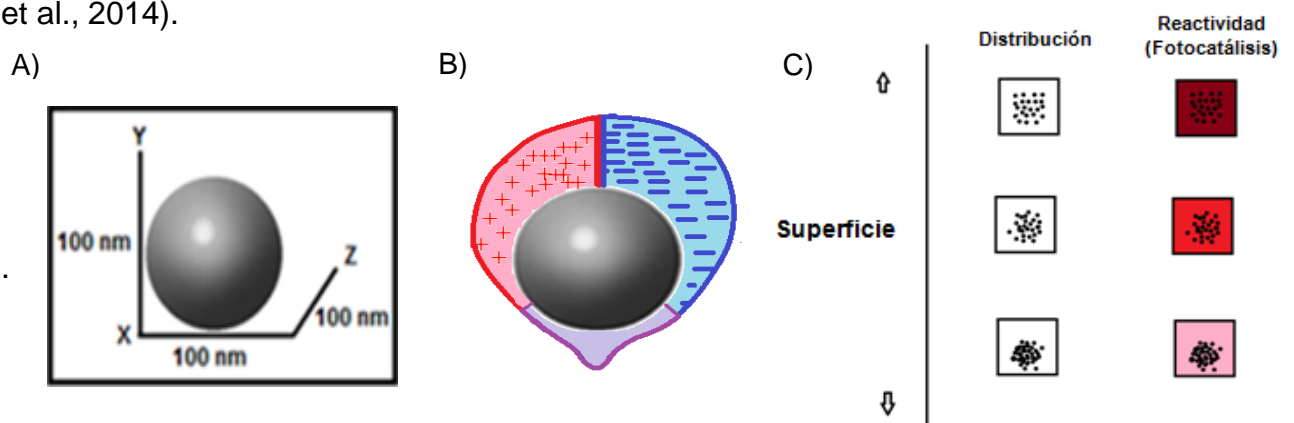
## **ÍNDICE DE GRÁFICAS**

1. Dureza de pellets medida en pascales
2. Monitoreo del alimento consumido semanalmente por los ratones alimentados con E171
3. Monitoreo del peso corporal de animales que consumieron alimento con E171
4. Dosis de consumo estimadas semanalmente
- 5 y 6. Pesos de testículos y epidídimos

## 1- INTRODUCCIÓN

### 1.1 Características de los nanomateriales manufacturados (NMM) grado alimenticio para evaluar su uso seguro en humanos.

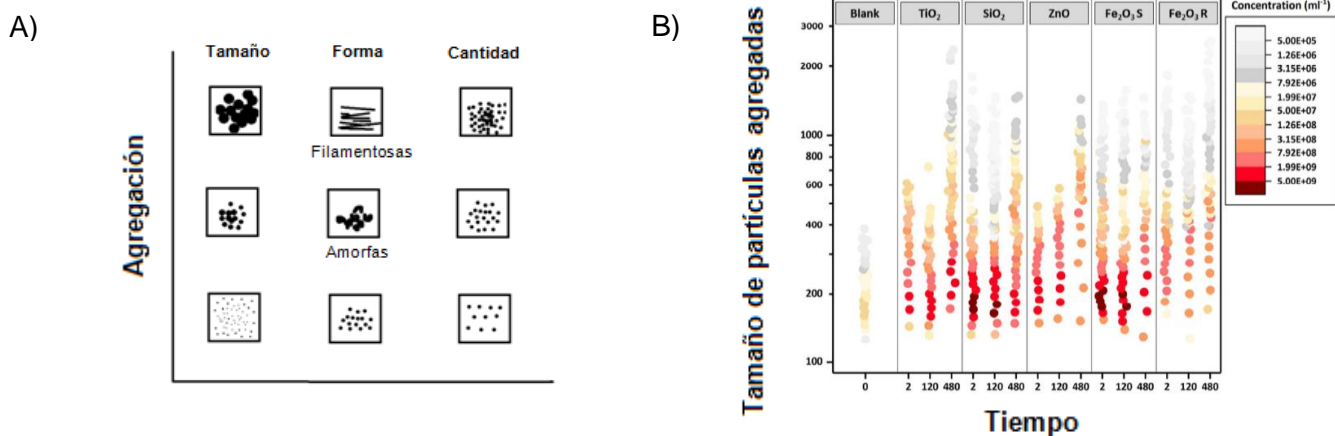
El interés en el desarrollo de nanomateriales manufacturados (NMM) se basa en el mejoramiento de la actividad de ciertos materiales al disminuir su tamaño, aumentar su área superficial y con esto la reactividad de superficie. La unidad de estudio de la nanotecnología son las nanopartículas (NPs), es decir partículas con al menos una de sus tres dimensiones igual o menor a 100 nm (Fig. 1, A). Los NMM están compuestos por más de 50% de su composición nanoparticulada (Schug et al., 2013). El desarrollo y evaluación de NMM los realizan instituciones americanas tales como el Instituto Nacional de Salud (NIH), el Departamento de Defensa (DOD), la Agencia de Protección Ambiental (EPA), el Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH), o la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA), todas por sus siglas en inglés (National Toxicology Project). Dependiendo del tipo de composición que tengan las NPs de los NMM, es que estos tendrán una carga (Fig. 1, B) y por lo tanto una capacidad de reactividad superficial. La actividad superficial de los NMM es directamente proporcional a la superficie capaz de reaccionar; y la superficie aumenta conforme las partículas tienen mayor distribución en el medio en el que se dispersen (Fig. 1, C). El empleo de una menor cantidad de material para lograr el mismo efecto ha hecho que los NMM grado alimenticio hayan adquirido importancia en su fabricación debido a que favorecen la percepción de calidad y conservación de los productos donde se añaden aumentando con esto la exposición humana a estos materiales. Algunos de estos NMM grado alimenticio son la plata (Ag), dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ), óxido de hierro (FeO), óxido de zinc (ZnO) o dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) por ejemplo en forma de E171. Para que los NMM grado alimenticio sean regulados y utilizados, se deben evaluar parámetros fisicoquímicos (FQ) y morfológicos relevantes en la determinación de su capacidad toxicológica (Vishwakarma et al., 2010; Gato et al., 2014).



**Fig. 1. Propiedades fisicoquímicas y morfológicas de las nanopartículas en medio líquido:** A) Tamaño nanométrico de una nanopartícula dentro del rango de los 100nm. B) Posibles cargas superficiales: positiva color rojo, negativa color azul o carga apolar, color morado. C) A mayor distribución mayor superficie; a mayor superficie mayor capacidad de reactividad. (Vishwakarma et al., 2010; Gato et al., 2014).

## 1.2 Propiedades generales fisicoquímicas (FQ) y morfológicas de los NMM en nanotoxicología

En la nanotoxicología se requiere la caracterización FQ y morfológica de las NPs de los NMM, para correlacionar con los efectos al exponerse a diferentes modelos de estudio. (OECD, 2009). Para determinar la seguridad y ausencia de capacidad tóxica de exposición a NPs se usan estudios *in vitro* o *in vivo* con implicaciones a nivel clínico, determinando límites seguros de exposición (OECD 2009; OECD 2015). Para evaluar el efecto *in vitro* e *in vivo* de las partículas de NMM grado alimenticio, se debe utilizar el producto que se ocupa como aditivo grado alimenticio, caracterizar éste en su forma seca, caracterizar la dispersión en medio simulando condiciones fisiológicas y utilizar dosis reales a las que se pueden presentar (Nel et al., 2013; Sohal et al., 2018). Su identificación química se evalúa al determinar la composición de la NP y de su corona o medio. De manera física se caracteriza la forma, cantidad y distribución del tamaño de partículas sin o con medio de dispersión que determinan su estado de agregación (Fig. 2, A). También se caracteriza la carga y tamaño superficial, factores altamente relacionados con su interacción con el medio y su área de superficie reactiva (Fig. 1, C). La dispersión en forma de polvo, el potencial zeta, la dispersión de partículas en medio y la cinética de disolución o degradación son determinaciones metodológicas (Stippler et al., 2014; OECD 2015; Avramescu et al., 2017; Sohal et al., 2018) que dan una idea de la manera en la que las NPs pueden interaccionar con las células (Lin et al., 2017). Los NMM grado alimenticio pueden variar de tamaño nanométrico y micrométrico dependiendo su agregación en el medio en el que se encuentre, por ejemplo, jugo intestinal (Fig. 2, B), además de variar respecto al tiempo. Los tamaños que puede presentar el  $\text{TiO}_2$  grado alimenticio en los líquidos gastrointestinales (GI) del intestino van desde los 100 hasta los 2000 nm como se observa en la Fig. 2, B, (Sohal et al., 2018).



**Fig. 2. Factores que determinan la agregación; evaluación de la distribución del tamaño de partículas en medio intestinal simulado:** A) A mayor tamaño, mayor capacidad de agregación; formas filamentosas se aglomeran más fácilmente que partículas amorfas y a su vez estas más que las de formas regulares; a mayor cantidad, mayor capacidad de agregación. B) Se muestra en diferentes colores las concentraciones (mayores de color rojo y menores de color gris) de agregados de partículas de cierto tamaño a tiempos de 2 min, 120 min y 480 min. (Freyre-fonseca et al., 2016; Sohal et al., 2018)

### 1.3 TiO<sub>2</sub> grado alimenticio o E171: empleo, regulación y exposición alimenticia

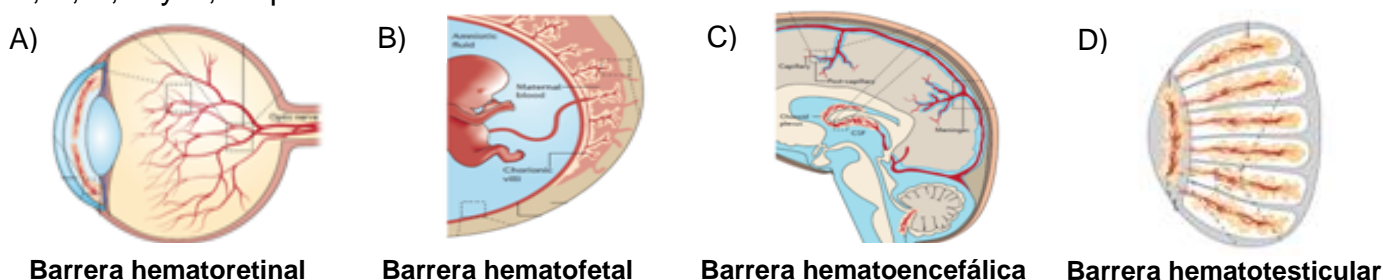
El principal nanomaterial manufacturado es el dióxido de titanio y su fabricación en grado alimenticio se denomina, E171 por la Unión Europea con más de 50 años de consumo humano (UE) (EFSA, 1969; Ans. F., 2016). El E171 es un polvo blanco que es ocupado principalmente para brindar color blanco a productos farmacéuticos como tabletas y vitaminas, productos de uso personal, como pastas dentales y productos alimenticios, como verduras secas y sopas enlatadas, helados, dulces confitados, chocolates, repostería, etc. (Fig. 3, A), (Skocaj et al., 2011; Rompellberge et al., 2016). Su adición favorece la presentación del alimento manteniendo sus componentes íntegros por más tiempo, y también al ser añadido en empaques por su capacidad microbicida (Sohal et al., 2018). En México es permitido el uso de E171 según las buenas prácticas de manufacturación (BPM), que permiten el empleo del aditivo hasta obtener el efecto deseado. Productos importados desde Estados Unidos son parte de la dieta de los mexicanos. En estos productos importados, la FDA (Fig. 3, B) regula el empleo de E171 para su uso oral, especificando que este debe estar constituido 99% de TiO<sub>2</sub>, evitar al máximo la presencia de metales pesados y es recomendado su empleo máximo de hasta 1% en alimentos. (Kusnesof et al., 2011; Lehto et al., 2017). Su tamaño principal de fabricación es entre 200-300 µm, es decir partículas micrométricas, que desde 1967 se ha asegurado no implican riesgo debido a su mínima absorción. Sin embargo, las partículas de E171, poseen un tamaño que va desde 30-250 nm, confirmándose un porcentaje entre 36% y 52% de partículas con un tamaño menor a 100 nm, es decir nanopartículas. (Yang et al., 2014; Faust et al., 2016). Por la ausencia de pruebas sustentables de efectos tóxicos la EFSA (Fig. 3, B), no ha considerado necesario determinar una ingesta diaria aceptable, manteniéndose una NOAEL, es decir una cantidad o "nivel sin efectos adversos observables" de 2250 mg/kg peso corporal (EFSA, 2016). Es principalmente en países europeos donde se ha reconsiderado los posibles efectos perjudiciales del E171. En Alemania se ha determinado las cantidades presentes de E171 en diversos productos de consumo cotidiano; esto, junto a patrones de consumo dependiendo la edad, ha permitido determinar las cantidades de ingesta diaria. Para jóvenes se estima una ingesta entre 0.2-10.4 mg/kg/día y para adultos de 0.2-6.8 mg/kg/día. (EFSA, 2016; Winkler et al., 2016).



**Fig. 3. Productos que contienen E171 e instituciones implicadas en su regulación:** A) Productos alimenticios: repostería, confitados, helados, sopas, cremas, etc; uso cotidiano: pasta dental; Fármacos: comprimidos (Skocaj et al., 2011; Rompellberge et al, 2016) B) Instituciones implicadas en la regulación de E171.

## 1.4 Distribución y efectos adversos del TiO<sub>2</sub>

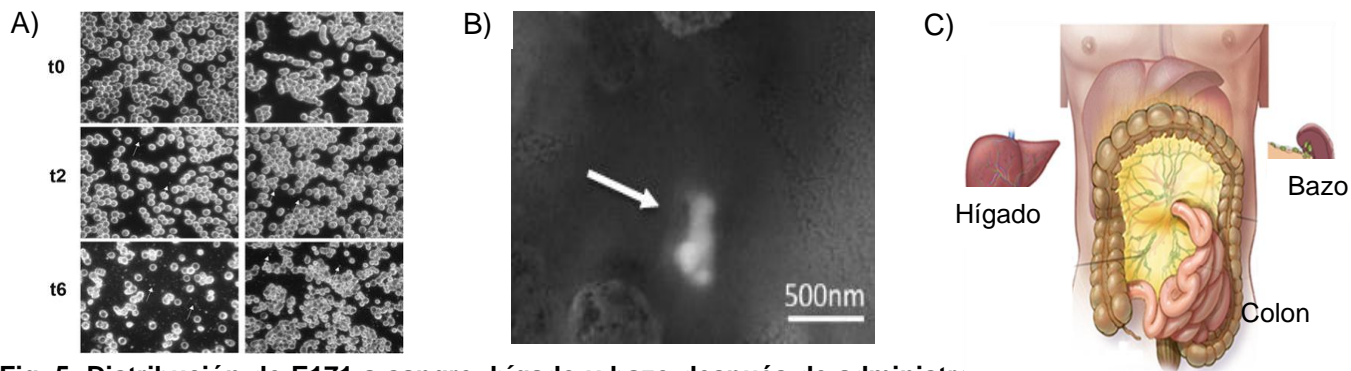
Aunque la exposición dérmica a TiO<sub>2</sub> ha demostrado ser segura debido a su mínima absorción, el TiO<sub>2</sub> ha sido denominado como posiblemente cancerígeno por vía inhalatoria, principalmente por exposición ocupacional (IARC 1989; Jones et al., 2015; NIOSH), los efectos por esta vía, hace de especial interés observar sus posibles efectos de manera oral. La acumulación de partículas nanométricas y micrométricas de TiO<sub>2</sub> ingeridas oralmente, puede ser en colon, placas de peyer, hígado, bazo, pulmones, mesenterio, intestino delgado, riñones y corazón (Jani et al., 1994, Jiangxue et al., 2007). Determinando la cantidad de titanio presente, se ha confirmado que órganos con gran circulación linfática, como hígado y bazo acumulan más titanio que órganos con menor circulación linfática, como los riñones (Jiangxue et al., 2007, Abdal et al., 2017). Tras 7 días de administración oral con partículas de TiO<sub>2</sub>, tamaño nanométrico y micrométrico, efectos genotóxicos han sido identificados en células de hígado y médula ósea; además aumenta el índice mitótico en epitelio estomacal y colónico, genera la presencia de doble núcleo en espermátides y aumenta el índice apoptótico en células testiculares (Sycheva et al., 2011). Dentro de la célula las partículas de TiO<sub>2</sub> generan estrés oxidativo, aumentando especies reactivas de oxígeno (ROS) y la actividad enzimática antioxidante, causando daño de material genético comprobado por ensayo cometa (Zhanjian et al., 2014). El efecto de las partículas de TiO<sub>2</sub> en las células de los diferentes órganos, depende de cuánto puedan distribuirse en ellos después de translocarse a circulación sanguínea y linfática. La absorción del TiO<sub>2</sub> a circulación depende de cuánto las partículas se dispersen sobre los más de 200 m<sup>2</sup> de epitelio del sistema gastrointestinal y esto a la vez depende de sus características fisicoquímicas y agregación de las partículas (Heringa et al., 2016) Faust et al., 2014). Las células en epitelio gastrointestinal que internalizan partículas son las células M, alineadas a placas de Peyer (Janer et al., 2014). Tras 7 días de administración oral con partículas de TiO<sub>2</sub> tamaño nanométrico y micrométrico, efectos genotóxicos fueron identificados en células de hígado y médula ósea; además aumenta el índice mitótico en epitelio estomacal y colónico, genera la presencia de doble núcleo en espermátides y aumenta el índice apoptótico en células testiculares (Sycheva et al., 2011). La presencia de la fracción nanométrica en el E171 ha generado el interés de saber si estas partículas pueden atravesar barreras físicas biológicas presentes en tejido ocular (Kreyling et al, 2017), neonatal (Notter et al., 2018), cerebral (Disdier et al., 2017) y testicular (Morgan et al, 2017) observados en la Fig. 4, A, B, C y D, respectivamente.



**Fig. 4. Algunos órganos con barrera hematoisular:** A) Ojo: Barrera hematorretinal, B) Placenta: Barrera placentaria C) Cerebro: Barrera hematoencefálica, D) Testículo: Barrera hematotesticular (Shechter et al., 2013).

### 1.4.1 Distribución y efectos adversos del E171

Debido a los efectos adversos del  $\text{TiO}_2$ , considerado posible carcinógeno vía inhalatoria, surge el interés de evaluar la capacidad carcinogénica del E171 por vía alimenticia. Ya que más del 99% del  $\text{TiO}_2$  se elimina por medio de las heces, el colon ha sido el órgano primario de estudio. Efectos genotóxicos asociados a carcinogénesis en colon, se han observado exponiendo de manera *In vitro* células colónicas a E171 generando rupturas simples de DNA y la alteración de material genético, confirmado por la formación de micronúcleos (Heloise et al., 2016). *In vivo* se ha confirmado la internalización de las partículas de E171 dentro de células colónicas, esto mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM); además puede favorecer la formación de criptas aberrantes en colon y ante enfermedades preexistentes inflamatorias, tales como colitis, el E171 ha demostrado capacidad de incrementar los efectos, llegando incluso a favorecer la formación de tumores (Urrutia-Ortega et al., 2016; Bettini et al., 2017). Con el consumo de 100 mg de E171 vía oral, se confirmó que el epitelio gastrointestinal permite la absorción de las partículas y su translocación a circulación sanguínea humana. Confirmado por microscopía de refracción, tal como se ve en la Fig. 5, A, y por medio de técnicas espectrométricas; aunque no se descarta su distribución vía linfática. Las partículas de E171 se encuentran en sangre completa en periodos de hasta 10 horas, con un pico máximo a las 6 horas (Pele et al., 2015). La acumulación de partículas de E171 ha sido confirmada mediante TEM y espectrometría de masas en hígado y bazo humanos, como se observa en la Fig. 5, B (Heringa et al., 2018). Partículas de entre 85 a 720 nm fueron encontradas en estos tejidos y un 24% del total de partículas a escala nanométrica. Esta distribución a hígado y bazo, Fig. 5, C, es semejante a la que se observa con NPs y micropartículas de  $\text{TiO}_2$  en roedores (Jani et al., 1994; Wang et al., 2007). El daño en hígado o riñones puede generar infertilidad debido a la consecuente disminución de Zinc, que afecta la espermatogénesis (Wong et al., 2000). Además se ha confirmado la distribución y efecto adverso de fracciones nanométricas de  $\text{TiO}_2$  en órganos reproductores (Wang et al., 2007; Gao et al., 2013; Jia et al., 2014; Meena et al., 2015; Smith et al., 2015; Orazizadeh et al., 2016; Shanin et al., 2017; Miura et al., 2017; Khorsandi et al., 2017; Morgan et al., 2017; Shanin et al., 2017; Song et al., 2017; El-Missiry et al., 2017; Sharafutdinova et al., 2018; Elnagar et al., 2018). Esta fracción nanométrica es capaz de llegar a los espermatozoides humanos los cuales al estar expuestos a las partículas generan estrés oxidativo, formando así ROS y consecuentemente genotoxicidad, además de apoptosis. La relación entre inflamación, estrés oxidativo, apoptosis y genotoxicidad se atribuye a los efectos de esta fracción nanométrica en testículos (Santonastaso et al., 2019).

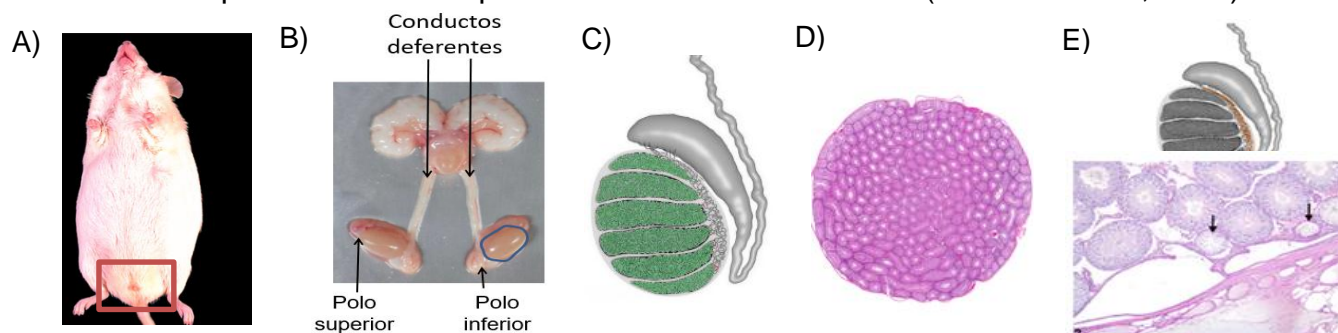


**Fig. 5. Distribución de E171 a sangre, hígado y bazo después de administr:** partículas refractantes de E171 en sangre completa. B) SEM de hígado seco donde se observa agregado de partículas de E171. C) Hígado y bazo humanos donde se acumula E171 de manera similar a como lo hacen las NPs y micropartículas de  $\text{TiO}_2$  en roedores (Jani et al., 1994; Wang et al., 2007; Heringa et al., 2018).



## 1.5 Anatomía e histología del testículo

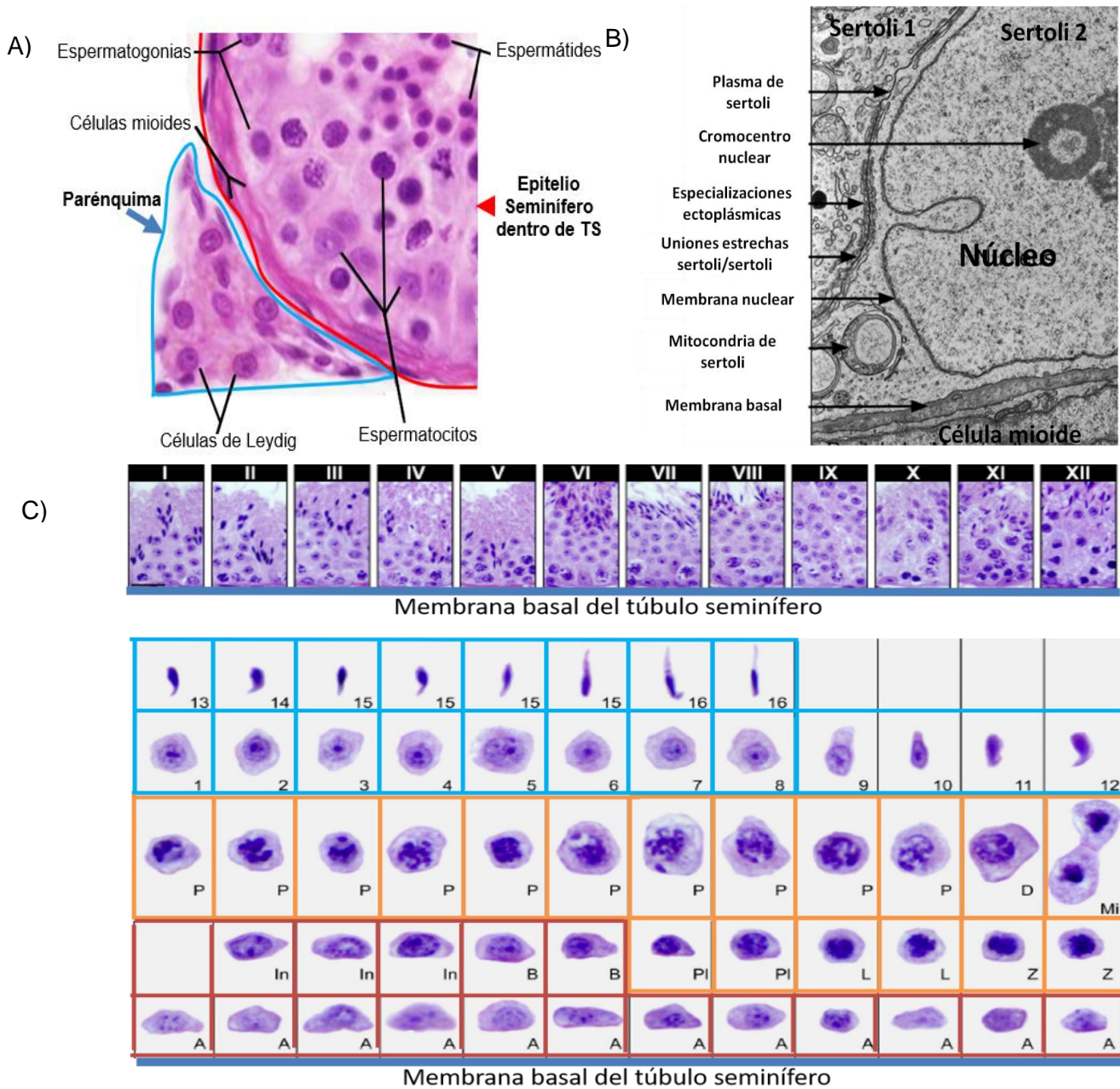
Los testículos, son órganos ovalados de 4-5 mm de largo y 2-3 mm de ancho en la edad adulta de color blanco rosado, de textura blanda y con función glandular encargados de la producción de testosterona y la diferenciación sexual. Los testículos se ubican en la región pélvica del ratón, marcada de rojo en la Fig. 6, A, están dispuestos en forma par ubicados dentro de la bolsa escrotal, presentando dos polos, uno superior y anterior, el otro inferior y posterior, señalados en la Fig. 6, B. Sobre el borde posteromedial se encuentra el epidídimo, tanto éste como los testículos, están rodeados por una membrana serosa llamada túnica vaginal. Una capa gruesa formada de colágeno llamada túnica albugínea (TA), genera una barrera física que rodea todo el testículo (Montoya et al., 2009). La composición de aminoácidos como hidroxiprolina y lisina en el colágeno determina que este pueda llevar a cabo su función específica de unión (Shayakhmetova et al., 2013). Los túbulos seminíferos (TS), marcados de color verde en la Fig. 6, C, son la unidad funcional del testículo y llevan a cabo la espermatogénesis, proceso especializado a la formación de los espermatozoides. Entre los túbulos seminíferos se encuentra el parénquima testicular conformado por vasos sanguíneos, vasos linfáticos, leucocitos y células de Leydig encargadas de la producción de testosterona (Fig. 7, A), (Hermo et al., 2010). El equilibrio homeostático de testosterona mantiene el ciclo espermatogénico además de un ambiente antiinflamatorio, propicio para la espermatogénesis en los TS (Hedger et al., 2015). Este equilibrio es también regulado por los diferentes tipos de leucocitos presentes en el parénquima testicular por su función en la respuesta inmune adaptativa. Un corte transversal de testículo permite la observación de la distribución de cada población celular del parénquima y de los TS a evaluar histológicamente como se ve Fig. 6, D. La calidad de las evaluaciones depende de que en las muestras se pueda observar cada túbulo bien delimitado y su espacio luminal (National Toxicology Project). La zona donde se une la parte terminal de los TS con epidídimo es la rete testis, de naranja en la Fig. 6, E. Por lo cual es común encontrar TS con aparente descamación de celular, pero esto es debido a la transición del epitelio hacia otro tipo al acercarse a la rete testis (Shechter et al., 2013).



**Fig. 6. Anatomía e histología de testículos:** A) Testículos de ratón después de disección, mostrando el polo superior e inferior y conductos deferentes. B) Esquema de la distribución de los TS en color verde dentro del testículo. C) Corte histológico transversal completo de testículo distribución de TS bien delimitados y parénquima rodeándolos entre túbulos. D) Retes testis (Naranja); corte histológico que muestra la conexión entre los TS y la rete testis, las flechas señalan localización de aparentes túbulos atrofiados que son en verdad TS con epitelio de transición. (National Toxicology Program)

### **1.5.1 Desarrollo espermático en epitelio germinal: papel de la barrera hematotesticular y su evaluación toxicológica**

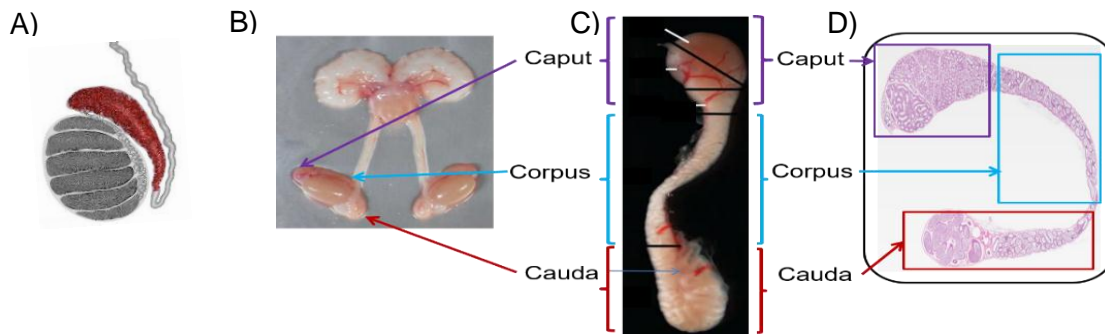
El epitelio germinal dentro de los TS se compone de células de sertoli (CS) que soportan mediante uniones celulares a las células germinales (CG) y permiten la espermatogénesis. Las CG se transformarán de espermatogonias (Sg) a espermátocitos (Sc) y finalmente en espermátides (Sd) en el epitelio germinal, como se ve en la Fig. 7 A, y al liberarse al lumen se denominan espermatozoides. En la base de los TS se encuentran las Sg, células en proceso mitótico exponencial; los Sc son células relacionadas al proceso meiótico, cuya función es la de generar a la célula haploide individual con 23 cromosomas y material genético mezclado; y finalmente las Sd, llevan a cabo la espermiogénesis en la que cambian la morfología y estructura interna de las células germinales hasta obtener la forma final del espermatozoide, ver Fig. 7 C (Tang et al., 2016). Las Sg con gran replicación celular requieren de los componentes solubles sanguíneos (Kerr et al., 2006) mientras que los Sc y Sd requieren estar aislados ya que los antígenos espermáticos de estas etapas son muy inmunogénicos (Brehm et al., 2005). La etapa meiótica del Sc y de espermiogénesis de la Sd están aisladas por la barrera hematotesticular (BHT) presente por encima de la Sg en un corte transversal. La BHT es una barrera física de proteínas de unión entre CS y CS, proteínas adaptadoras que actúan como moléculas señalizadoras y/o de unión, además de componentes citoplasmáticos como retículo endoplásmico o especializaciones ectoplásmicas (E.E.) compuestas por rollos de filamentos de actina señalados en la Fig. 7 B. La N-cadherina junto con otros tipos de proteínas de unión, regulan procesos celulares y unen las membranas de las CS adyacentes (Mochele et al., 2008). Uno de estos procesos celulares es el desensamble de la BHT encima de las Sg para después ensamblarse nuevamente por debajo de estas, permitiéndole entrar en etapa de meiosis. La BHT se vuelve a ensamblar por encima de las Sgs aún en proceso de mitosis. Para que se mantenga este proceso de manera cíclica, se requiere la interacción de células del parénquima y de los túbulos seminíferos incluyendo a las células mioideas de la Fig. 7, A (Yan Cheng et al., 2009). La disminución de las proteínas que conforman la BHT, pueden ser desfavorables para el mantenimiento adecuado de la espermatogénesis (Cheng et al., 2008) y para el ambiente inmunotolerante que se mantiene en los testículos. Este ambiente depende de linfocitos, macrófagos testiculares y células dendríticas en parénquima, que cumplen sus funciones normales de protección inmunológica al mismo tiempo que regulan la espermatogénesis (Hedger et al., 2002; Hedger et al., 2015). Estas células inmunes son las únicas que expresan MHC II (Meinhart & Hedger, 2011; Neefies et al., 2011; DeFalco et al., 2015). Además la disminución en la calidad y cantidad de espermatozoides como efecto de diferentes tóxicos, se puede deber a desajustes en hormonas sexuales o procesos inflamatorios que afectan la integridad de la BHT (Ching-Hang et al., 2005; Pearl et al., 2013). La evaluación histológica de los órganos del desarrollo espermático permite tener una idea de la relación entre la arquitectura celular de los órganos y por qué los espermatozoides son capaces o incapaces de desarrollarse e interactuar en el tracto femenino y fertilizar al oocito (Florman et al., 2015).



**Fig. 7. Epitelio germinal, barrera hematotesticular y proceso de espermatogénesis:** A) Histología con ubicación de Sg, Sc y Sd dentro del epitelio germinal en túbulos seminíferos delimitados por línea roja que indica la ubicación de la membrana basal (MB) y parénquima testicular con células de Leydig delimitado por línea azul. B) Esquema de la localización de BHT en epitelio germinal: Se muestra la altura a la que se encuentran las uniones entre células de sertoli que forman la BHT; por debajo de BHT se encuentra las Sg, que reposan encima de la MB de color azul, por encima células de Sertoli sostienen a Sc y espermátides Sd. En el parénquima por debajo de M.B. se encuentran células de Leydig, Macrófagos (MΦ), endotelio sanguíneo (E.S.) y endotelio linfático. C) Figura del proceso espermatogénico en el ratón mostrando las 12 diferentes fases, cada una con su asociación celular específica I- Histología de las asociaciones celulares de cada fase, desde la fase I de la parte inferior izquierda hasta la fase XII (Duración 35-40 días). II- En color rojo se muestra el desarrollo morfológico y nuclear de las Sg, cuyo proceso mitótico dura aproximadamente 12-13 días. En color naranja se muestra el desarrollo morfológico y nuclear de los Sc, cuyo proceso meiótico dura aproximadamente 12-13 días, culminando en dos divisiones meióticas y la generación de la célula haploide (Mi). El proceso de espermiogénesis de las Sd, señalado en color azul, atraviesa los procesos de diferenciación morfológicos y nucleares, nombrados con base en el cambio intracelular en la CG, según la fase; Comenzando por la fase golgi, capuchon, acrosomal y finalmente maduración.

## 1.6 Anatomía e histología de epidídimo

El epidídimo es un órgano en forma de coma, conformado por un solo tubo contorneado cuyo tamaño en el ratón es de 1 m, delimitado por una cápsula fibrosa formando un saco escrotal de 2-2.5 cm, delimitado en Fig 8, A. El epidídimo está apoyado sobre el borde posteromedial del mediastino del testículo, se encuentra unido por un ligamento superior y uno inferior, como se ve en Fig. 8, B. La parte adyacente en donde conecta el epidídimo con el testículo en el polo superior se denomina caput del epidídimo, termina en la región curvada en forma de embudo como se observa en la Fig. 8, C (Robaire & Hinton, 2015). La región corpus se distingue por ser la zona del epidídimo más delgada y que recorre la zona caudolateral del testículo, termina en donde se engrosa el saco del epidídimo, comenzando el polo inferior. La última región del epidídimo es la cauda, más distal a la conexión con testículo ubicada en el polo inferior, se muestra el epidídimo extendido en la Fig. 8, C. El epidídimo es el órgano en donde el espermatozoide termina de desarrollarse una vez fuera del testículo, proceso llamado maduración. Después de atravesar la rete testis, el Sz es infértil y este no presenta el perfil de proteínas membranales adecuado como para fecundar al oocito o activar la hipermotilidad dentro del tracto femenino (De Grava Kempinas et al., 2014). Estas capacidades solo las obtiene después de atravesar el caput y corpus del epidídimo, donde se agregan, retiran y modifican proteínas del espermatozoide (Martin-De Leon, 2015). Este se encuentra diferenciado según la localización más proximal o distal a la zona de la rete testis del testículo. La óptima función de cada sección del epidídimo favorece la obtención de todas las condiciones de quimioatracción y unión al óocito que las células germinales necesitan. La modificación membranal se da en la región caput y corpus, en la zona cauda se almacenan los espermatozoides ya formados (Cooper et al., 2011). El epitelio epididimal conformado por células basales, principales, claras, halo, apicales o dendríticas reaccionan a los componentes de la luz de los TS (Gregory et al., 2014). Las células varían en proporción dependiendo la región del epidídimo como se observa en la Fig. 8, D y en conjunto mantienen la homeostasis inmunológica y la correcta maduración espermática (Guiton et al., 2013).

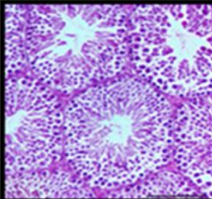
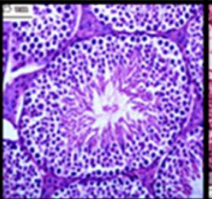
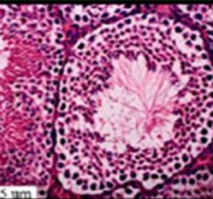
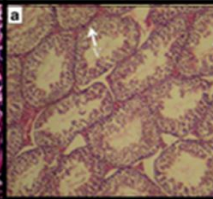
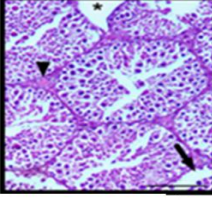
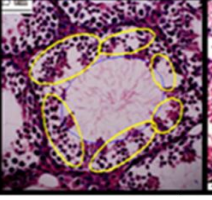
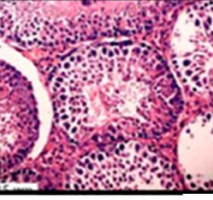
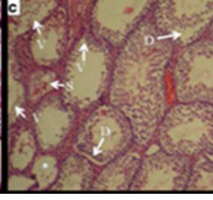


**Fig. 8. Anatomía e histología de epidídimo:** A) Epidídimo color blanco rosáceo, por encima de testículo, desde polo inferior hasta polo superior B) Epidídimo separado de testículo y extendido C) diferentes secciones histológicamente identificables de epidídimo (color rojo obscuro); de manera histológica se divide en zona caput (morado), región corpus (azul) y cauda (rojo). (National Toxicology Project).

## 1.7 Efectos de NP de dióxido de titanio en órganos del desarrollo espermático

La administración a dosis única de NPs de  $\text{TiO}_2$  vía intravenosa a dosis menores de 10 mg/kg, ha comprobado no tener alteraciones en testículos (Miura et al., 2017), sin embargo, a dosis de 50 mg/kg, genera acumulación en testículo junto con decremento en testosterona y daño a DNA (Meena et al., 2015). Inyecciones intraperitoneales, en repeticiones de tres generan alteraciones flagelares y acrosomales, así como un aumento en el perfil inflamatorio, acompañado por un aumento en citocinas proinflamatorias. Estos efectos pueden visualizarse histológicamente evidenciado por un aumento en el grosor y células del parénquima testicular, teniendo en cuenta que este tipo de administración evita la absorción intestinal. El efecto de las NPs como causantes de estos efectos se confirmaron al observarse las partículas por TEM en tejido escrotal (Smith et al., 2015). Con dosis de 50 mg/kg y 250 mg/kg de manera oral las NPs de  $\text{TiO}_2$  generan disminución de testosterona sérica y descamación de células germinales (Jia et al., 2014; Shanin et al., 2017). Además de presentar a dosis de 50 mg/kg disminución de la actividad proliferativa y de diferenciación en las células de epitelio germinal (Sharafutdinova et al., 2018). Las NPs de  $\text{TiO}_2$  a dosis mayores a 50 mg/kg durante por lo menos 1 semana, se han utilizado como modelo de daño testicular asociado a estrés oxidativo, que puede generar daño a material genético y apoptosis por estrés oxidativo; aunque dosis orales únicas aun siendo de 5g/kg no generan efectos adversos observables después de dos semanas (Wang et al., 2007). Los efectos tóxicos testiculares de las NPs de  $\text{TiO}_2$  se ven aminorados por la administración paralela de sustancias antioxidantes (Orazizadeh et al., 2016; Khorsandi et al., 2017; Morgan et al., 2017; Shanin et al., 2017; Elnagar et al., 2018). Efectos histopatológicos de las NPs de  $\text{TiO}_2$  como la descamación de células germinales se relaciona a una disminución en la cantidad de espermatozoides. El daño a nivel histológico mostrado en la figura 9 por estrés oxidativo, puede presentarse en administraciones con dosis de 5 y 10 mg/kg de NPs de  $\text{TiO}_2$  en hidroxipropilmetilcelulosa por más de 60 días (Gao et al., 2013; Hong et al., 2015) o PBS/Twin 80 por más de 28 días (Song et al., 2017) e incluso 2.5 mg/kg durante 90 días (El-Missiry et al., 2017). La mayoría de los estudios que evalúan los efectos del  $\text{TiO}_2$  no utilizan la forma de grado alimenticio y la matriz de dispersión usada es en medió líquido. El único estudio donde se evalúa el  $\text{TiO}_2$  en una matriz sólida, no indica qué tipo de  $\text{TiO}_2$  se ocupa ni la caracterización de éste, aunque también presenta alteraciones histopatológicas en testículo (Nabela et al., 2010). Afectaciones histopatológicas similares a las generadas por las NPs de  $\text{TiO}_2$  asociadas a daño en BHT se presentan con otros controles positivos como la administración de Cadmio (Cd) o material particulado (PMs) que se relacionan con disminución en la calidad y cantidad de espermatozoides formados como se observa en la Fig 9 (Gao et al., 2013; Orazizadeh et al., 2014; Fashui et al., 2016; Squadrito et al., 2016; Liu et al., 2017). Las micropartículas o NPs de  $\text{TiO}_2$  pueden llegar a testículos y afectar la integridad de la BHT (Cao et al., 2017). El daño en testículo y epidídimo puede ser también indirecto debido a la afectación de hígado o riñones, que se asocian a infertilidad cuando éstos presenta estados patológicos (Wang et al., 2007). La disrupción endócrina, la síntesis de factores proinflamatorios, el proceso inflamatorio y el estrés oxidativo asociado a este o a cuando las partículas son endocitadas por las células pueden ser causa de daño histológico (Creasy et al., 2012). La correcta

comunicación celular es vital para mantener el correcto desarrollo espermatogénico, equilibrio que se pierde al presentarse procesos inflamatorios. Las NPs de  $\text{TiO}_2$  también son capaces de generar activación inmunológica, evidenciada histológicamente con la presencia de infiltrado de células inflamatorias (Pandey et al., 2018). La activación de procesos inflamatorios se evidencia ante el aumento de la expresión de moléculas TLR 3 y 4, asociados a la identificación de partículas ajenas al individuo o censando productos de estrés oxidativo, además de otras citocinas proinflamatorias e infiltrado de células inflamatorias, como consecuencia de la administración intragástrica (IG) de NPs de  $\text{TiO}_2$  (Hong et al, 2015). Las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos son capaces de generar estrés oxidativo al ser internalizadas. Estas agresiones repercuten en las células germinales, cuya disminución correlaciona con las bajas cantidades de espermatozoides y altas cantidades de espermatozoides con alteraciones morfológicas tras la exposición a NPs de  $\text{TiO}_2$ . En epidídimo es posible encontrar menor cantidad de espermatozoides dentro del lumen de este órgano cuando existe afectación en espermatogénesis (Creasy et al., 2012). El daño al epitelio epididimal depende de la cantidad de partículas, aumentando la cantidad de rupturas del epitelio, daño nuclear y a más grandes cantidades de NPs de  $\text{TiO}_2$  (De Grava Kempinas et al., 2014). Las alteraciones en aparato reproductivo por NPs son capaces de impedir que se lleven a cabo las modificaciones membranales y la activación de hipermotilidad en espermatozoides (Brohi et al., 2017).

	A) Squadrito et al., 2016	B) Gao et al., 2013	C) Fashui et al., 2016	D) Orazizadeh et al., 2014
<b>Control</b>				
<b>Administración vía oral</b>				
<b>Modelo animal y de administración</b>	CdCl <sub>2</sub> C57 BL/6J 2 mg/kg SSF 14 días	NP 5-6 nm CD1 Control región 5 mg/kg Hidroxipropilmeti celulosa 90 días	NP 5-6 nm ICR Control región 5 mg/kg Hidroxipropilmeti celulosa 60 días	NP Sigma Naval Medical Research Institute 300 mg/kg MiliQ 35 días
<b>Alteraciones histológicas</b>	Desprendimiento epitelial Desorganización epitelio Extravasación	Vacuolizaciones Descamación germinal	Desprendimiento epitelial Desorganización epitelio Infiltrado inflamatorio	Desprendimiento epitelial Desorganización epitelio Vacuolización Descamación germinal

**Fig. 9. Alteraciones histológicas testiculares por compuestos tóxicos:** A) Muestra alteraciones histológicas relacionadas al daño de la BHT inducidas por Cd; B), C) y D) muestran alteraciones histológicas causadas por NPs de  $\text{TiO}_2$ .

**TABLA 1. RESUMEN DE ESTUDIOS DE LOS EFECTOS DEL DIÓXIDO DE TITANIO EN TESTÍCULOS DE ROEDORES**

Partículas usadas	Vehículo y método de dispersión para administración <i>in vivo</i>	Caracterización	Dosis	Ruta de administración	Modelo	Hallazgos	Cantidad de disminución en testosterona sérica	Descripción histológica	Referencia
Nanopartículas de dióxido de titanio (Hangzhou Dayang Nanotechnology Co. Ltd)	3g de TiO <sub>2</sub> fueron dispersados en 12 mL de 0.5% p/v hydroxipropilmetilcelulosa, sonicadas por 15-20 min y mecánicamente vibradas por 2 o 3 minutos.	Microscopía electrónica de transmisión y técnica de fluorescencia de rayos X  Los tamaños observados por coinciden con los tamaños nominales.	Dosis única de 5 g/kg <sub>pc</sub> y muestreo después de dos semanas	Administración intragástrica en un minuto.	Ratones CD-1 macho	Sin alteración en testículos.	No datos	Sin datos	Wang et al., 2007.
Dióxido de titanio (Sigma Aldrich)	Sin datos	Sin datos	Sin datos.  Estudio de 65 días.	El estudio indica que "...grupos alimentados con raciones conteniendo 1% y 2% de TiO <sub>2</sub> " pero no es claro si está contenido en la comida.	Ratas albinas macho (180-200g)	Anorexia, heces blancas, disminución en el peso corporal, disminución en el conteo espermático, viabilidad, y motilidad. Aumento en las anomalías espermáticas.	Disminución de testosterona de 1.92 ± 0.71 ng/mL a 0.62 ± 0.21 y a 0.573 ± 0.33 ng/mL con tratamientos de 1% y 2%, respectivamente. La testosterona disminuyó 32% y 30% con los tratamientos de 1% y 2% respectivamente.	Espermatogénesis y congestión de vaso sanguíneo.	Nabela et al., 2010.
Nanopartículas de dióxido de titanio sintetizadas por hidrólisis de tetrabutoxido de titanio.	Hydroxipropilmetilcelulosa usada para dispersión con agua desionizada y agua destilada después de 12 h y 24 de incubación.	Caracterización descrita en otro estudio previamente publicado. Tamaño hidrodinámico de aglomerados fue de 294 nm, potencial zeta después de 12 horas fue de 7.57 mV. Para partículas de 5-6 nm el área de superficie fue de 174.8m <sup>2</sup> /g.	2.5, 5, y 10 mg/kg <sub>pc</sub> por 90 días.	Administración intragástrica	Ratones macho CD-1 (5 semanas de edad)	Incremento en contenido de titanio en testículos, disminución en conteo y motilidad espermática	Disminución de testosterona de 103 ± 5.16 ng/dL a 92 ± 4.6, 81 ± 4.05 y 73 ± 3.67 ng/dL con tratamientos de 1%, 5 y 10 mg/kg <sub>pc</sub> respectivamente.  Disminución de testosterona de 8%, 22% y 30 % con tratamientos de 2.5, 5 y 10 mg/kg <sub>pc</sub> respectivamente. Todos los tratamientos mostraron diferencias.	Rupturas espermáticas, rarefacción y apoptosis de células de Sertoli, necrosis de túbulos seminíferos. Disminución del grosor de la lámina germinativa, vacuolización y arreglo irregular de células de Sertoli de los túbulos seminíferos.	Gao et al., 2013.
Nanopartículas de dióxido de titanio (Sigma Aldrich)	Nanopartículas fueron dispersadas en PBS (pH 7.4) con 0.5% Tween 80 y preparadas con ultrasonificación por 30 min.	Imágenes de aglomerados obtenidas por microscopía electrónica de transmisión	10, 50 or 250 mg/kg <sub>pc</sub> al día que termino tras 42 días consecutivos	Administración oral	Ratones Kunming macho (3 semanas de edad)	La dosis más alta disminuyó el peso corporal. Cambios en la morfología espermática en las dos dosis más altas. Disminución en la expresión de P450-17 y 17β-HSD, aumento en la expresión de Cyp19.	Testosterona disminuyó de alrededor de 1.7 ng/μL a 0.8, 0.7 and 0.6 ng/μL con tratamientos de 10, 50 y 250 mg/kg <sub>pc</sub> . Solo tratamientos de 50 y 250 mg/kg mostraron diferencias significativas con reducciones de 59% y 64%, respectivamente.	Vacuolas en túbulos seminíferos de ratones tratados con 50 y 250 mg/kg/día de nano-TiO <sub>2</sub> . Disminución en hileras de células espermáticas fueron observadas en la dosis mayor de 250 mg/kg/día.	Jia et al., 2014.
Nanopartículas de dióxido de titanio (Sigma)	El stock de 2 mg/mL fue preparado en agua Milli-Q y sonicada a 4°C 10 min. Este stock fue usado para experimentación diluida usando agua Milli-Q (solución estable por 7 días).	Sin datos	300 mg/kg <sub>pc</sub> por 35 días	Administración intragástrica	Ratones machos adultos del Instituto de investigación médica naval (6-8 semanas de edad, 25-30g)	Disminución en peso de testículos, conteo y motilidad espermática. Incremento en anomalía espermática.	Disminución de la testosterona de alrededor de 3 ng/mL a 0.5 ng/mL con tratamientos de 300mg/kg <sub>pc</sub> . Disminución de la testosterona del 83.3% con tratamiento de 300mg/kg <sub>pc</sub> .	Incremento en desprendimiento, descamación y vacuolización de los túbulos seminíferos y puntuación de Johnsen's disminuida.	Orazizadeh et al., 2016.

Nanopartículas de dióxido de titanio sintetizadas por hidrólisis de tetrabutoxido de titanio.	Polvo de TiO <sub>2</sub> -NPs fue disperse en la superficies de 0.5% p/v en solución de Hydroxiopropilmetilcelulultrasonica da por 30 min y mecánicamente vibrada por 5 minutos.	Caracterización realizada en otro estudio previamente publicado.	2,5, 5, y 10 mg/kg <sub>pc</sub> por 60 días.	Administración intragástrica	Ratones macho ICR (5 semanas de edad)	Disminución en consumo de comida y agua, incremento en espermatozoides anormales, disminución en peso testicular e incremento en estrés oxidativo en testículos.	Sin datos	Degeneración de epitelio de túbulos seminíferos, disminución de células de leydig y aumento de anomalidades espermáticas.	Hong et al., 2015.
Nanopartículas de dióxido de titanio (Sigma-Aldrich, USA)	TiO <sub>2</sub> 1M in PBS  Sin datos en el método de dispersión	Los TiO <sub>2</sub> -NP (50 µg / ml) se disolvieron en agua destilada y se sometieron a ultrasonificación durante 10 minutos para obtener una suspensión homogénea para determinar el tamaño de las partículas, la morfología y la distribución de tamaños mediante microscopia electrónica de transmisión y difracción de rayos X.	5, 25, y 50 mg/kg <sub>bw</sub> una vez a la semana por 30 días.	Inyección intravenosa	Ratas Wistar macho  (8 semanas de edad)	Acumulación de titanio en los testículos, daño en el ADN de espermatozoides.	El nivel de testosterona sérica disminuyó en el grupo de control (7,44 ± 0,37 ng / mg de proteína) en comparación con el grupo de control (7,44 ± 0,62). Esta es una reducción del 34%. No hubo diferencias significativas en el nivel de esperma de testosterona entre los grupos de 5 y 25 mg / kg y los grupos de control.	Disrupción de los túbulos e inflamación en las células testiculares.	Meena et al., 2015.
Nanopartículas de dióxido de titanio sintetizadas mediante proceso de deposición química de vapor utilizando tetraisopropóxido de titanio.  Tamaño: 50 ± 8 nm	PBS  Sin datos en el método de dispersión	Imágenes de aglomerados hidrodinámicos por microscopia electrónica de transmisión.	Tres inyecciones de 2.5 y 5 mg/kg <sub>pc</sub> . Sacrificios a corto (24h, 48h y 120h) y largo tiempo (1, 2, 3 o 5 semanas).	Inyección intraperitoneal	Ratones machos cruzados de cepas ICR y C57BL/6  (3-6 meses de edad)	Perfil inflamatorio, anomalías espermáticas y producción de ROS en espermatozoides.  Detección de partículas sospechosas de ser tejido escrotal adiposo de TiO <sub>2</sub> NP.	Sin datos	Pérdida de células germinales en los túbulos seminíferos y aumento de los espacios intersticiales en el parénquima.	Smith et al., 2015.
Nanopartículas de dióxido de titanio (Sigma)  Tamaño: 20-30 nm	El stock de 10 mg / ml se preparó en albúmina de suero bovino y se sonicó a 4° C. Este material se usó para la experimentación con animales utilizando agua Milli-Q como vehículo.  (Solución estable durante 7 días).	Microscopia de fuerza atómica para distribución de tamaño y uso del mismo material para experimentación con animales.	75, 150 y 300 mg/kg <sub>pc</sub> por 35 días.	Administración intragástrica	Ratones machos adultos del Instituto Médico Naval de Investigación (NMRI)  (6-8 semanas de edad)	Disminución del conteo y motilidad espermática. Túbulos positivos a apoptosis.	La testosterona disminuyó de 3 ng / mg a alrededor de 2.5, 1.7 y 0.5 en tratamientos de 75, 150 y 300 mg/kg <sub>pc</sub> respectivamente. Solo los tratamientos de 100 y 300 mg/kg <sub>pc</sub> mostraron diferencias significativas con reducciones de 43 y 70% respectivamente. Esto fue lo mismo para los testículos.	Se produjeron cambios degenerativos en las células germinales, que van desde la pérdida de espermátides alargadas, la desorganización de las capas de células germinales y el desprendimiento y desprendimiento a la vacuolización de los túbulos seminíferos que contribuyen a la atrofia.	Khorsandi et al., 2016.
Nanopartículas de dióxido de titanio Anatasa (637254) proporcionada por Sigma Chemical Co.	Ultrasonificación por 15 min en agua bebible.	La forma y el tamaño fueron determinados por TEM. El tamaño era inferior a 25 nm.	2,5, 5 y 10 mg / kg de peso corporal por día durante tres meses.  Otro grupo recibió 5 mg/kg <sub>pc</sub> /día durante cinco meses.	Administración oral (agua de beber)	Ratas Wistar macho adultas (146 ± 2 g)	Aumento del contenido de titanio al aumentar la dosis de exposición. Anomalías espermáticas, disminución de la testosterona sérica, hormona luteinizante, hormona folicular estimulante y dehidroepiandrosterona. Apoptosis espermatozoides.	Sin datos	Núcleos picnóticos y degeneración del epitelio seminífero con espacios vacuolares. Destrucción y deformidad de células intersticiales y de Leydig.	El-Missiry et al., 2017.



Dióxido de titanio (Aeroxide-P25) de Sigma-Aldrich	Esterilización de NP mediante esterilizador de calor seco a 180°C durante 1 hr 2 mg de NP suspendidos en 2 ml de fosfato de sodio. Sonicación en baño de agua durante 30 minutos.	Sin datos	0,1, 1, 2 o 10 mg/kg <sub>pc</sub> una vez a la semana por 4 semanas	Inyección intravenosa	Ratones C57BL/6J macho	Función testicular, reducción en el movimiento de los espermatozoides, sin cambios en los niveles plasmáticos de hormonas.  No hay contenido detectable de Ti en los testículos. Sólo se observaron trazas.	Sin datos	Sin datos	Miura et al., 2017.
Nanopartículas de dióxido de titanio	Sin datos	Sin datos	100 mg/kg <sub>pc</sub> diario por 8 semanas	Administración intragástrica	Ratas albinas macho	Anormalidades espermáticas y apoptosis en túbulos seminíferos.	La testosterona sérica disminuyó de 2.40 a 0.94 ng/ml en ratas expuestas, lo que representa un 39% menos que el grupo control.	Edema y desprendimiento de células germinales con pínosis de capas espermatogoniales.	Morgan et al., 2017.
Nanopartículas de dióxido de titanio (Sigma-Aldrich, EE. UU.)  (99.7% anatasa, tamaño de partícula <25 nm).	Suspendido en solución salina, dispersado por vibración ultrasónica durante 15 min	Sin datos	50 mg/kg <sub>pc</sub> /día por 1, 2 y 3 semanas.	Administración intragástrica	Ratas Wistar macho adultas (180-220 g, 6-7 semanas de edad)	Alteración de los niveles de glutatión y apoptosis en testículos. Lesión testicular medida como actividad de la fosfatasa ácida.	Disminución de testosterona sérica en un 37.5%, 57.1% y 73% en 1, 2 y 3 semanas de exposición a TiO <sub>2</sub> , respectivamente.	Anomalías del epitelio seminífero y engrosamiento del parénquima.	Shahin et al., 2017.
Nanopartículas de dióxido de titanio (Shanghai Jingchun Reagent)  Tamaño: 5-10 nm	Dispersado en PBS (pH 7,4) con Tween 80 al 0,5% y 30 min ultrasonificado.	Microscopio de transmisión por electrones. Las partículas tenían forma rabaditiforme, el diámetro era de aproximadamente 10 nm.	0, 10, 50 y 100 mg/kg <sub>pc</sub> diariamente durante 28 días, los animales se mantuvieron en ayunas 4 horas antes y después de la administración.	Administración intragástrica	Ratones ICR macho (6 semanas de edad)	Malformación de los espermatozoides. Aumento de la tasa de micronúcleos en las células espermáticas. Acumulación reactiva de oxígeno y disminución de la actividad del superóxido dismutasa.	Sin datos	Reducción del número de células germinales, desalineación de la esferospermia y vacuolización de células espermatogénicas en los tejidos testiculares.	Song et al., 2017.
Nanopartículas de dióxido de titanio (Titanos, China) dimensionadas a 21 nm según la descripción del fabricante	Goma acacia en solución al 5%. No hay datos sobre el método de dispersión.	Sin datos	1200mg/kg <sub>pc</sub> diarios durante 12 semanas.	Administración intragástrica	Ratas albinas macho (150-200 g)	Daño en el ADN de los testículos.	La testosterona disminuyó de 23.8 ± 8.8 en el grupo control a 0.38 ± 0.0 nmol/L en el grupo tratado. La testosterona disminuyó 98.41%.	Marcada desorganización de células espermatogénicas, desprendimiento de epitelio en túbulos seminíferos. Inflamación y deposición de colágeno.	Elnagar et al., 2018.
Dióxido de titanio forma Rutilo (Tamaño: 40-60 nm)	Dispersas en agua destilada y ultrasonificadas	Sin datos	50 mg/kg <sub>pc</sub> por 14 y 30 días.	Administración oral	Ratas Wistar adultas macho (170-210 g)	Cambios morfológicos en los testículos. Actividad proliferativa de la alteración de las células espermáticas y disminución del potencial de diferenciación.	Sin datos	Desprendimiento de epitelio y desprendimiento de células espermáticas.	Sharafutdinova et al., 2018.
PBS: Buffer de sales de fosfato. TEM: Microscopía electrónica de transmisión. ROS: Especies reactivas de oxígeno									

## **2- JUSTIFICACIÓN**

La ingesta de dióxido de titanio grado alimenticio E171 ha sido considerada segura, sin embargo la presencia de una fracción nanométrica y la ausencia de datos de consumo de E171 en una matriz sólida, han sido motivantes para evaluar su seguridad en órganos del desarrollo espermático. Los datos de toxicidad en órganos reproductivos son relevantes para la reevaluación de la regulación de E171.

### **3- HIPÓTESIS**

Si se alimentan a ratones durante 7 semanas con una dieta de alimento adicionada con E171, se observarán efectos tóxicos a nivel histológico en órganos encargados del desarrollo espermático. El daño en testículo asociado a procesos inflamatorios y daño a BHT en testículo.

## 4- OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar en testículos y epidídimos, órganos encargados del desarrollo espermático de ratones BALB/c el efecto a nivel histológico de la alimentación con pellets adicionados con cantidades de 0.1, 0.5 y 1% de E171 después de 7 semanas.

### 4.2 Objetivos particulares

- Preparar con alimento para roedores ENVIGO pellets re-horneados sin E171 y con proporciones de 0.1, 0.5 y 1% de E171 respecto al peso del alimento, para administrar de forma *ad libitum* a ratones BALB/c machos durante 7 semanas.
- Caracterizar el tamaño y forma de las partículas que componen el E171 en forma de polvo, mediante microscopia electrónica de barrido.
- Caracterizar el tamaño hidrodinámico, potencial Z e índice de polidispersión, del alimento con E171, disperso en líquido gástrico simulado y fluído intestinal simulado.
- Cuantificar alteraciones histológicas en cortes transversales de testículo como desprendimiento de epitelio germinal, descamación de células germinales en túbulos seminíferos y cantidad de células del parénquima en los testículos de ratones con dieta control y con proporciones de 0.1, 0.5 y 1% de E171.
- Valorar el proceso inflamatorio mediante inmunodetección de MHC II, en testículos de ratones con dieta control y de proporciones de 0.1, 0.5 y 1% de E171.
- Evaluar la integridad de la BHT mediante inmunodetección de N-cadherina y colágeno I en cortes transversales de testículos de ratones con dieta control y con proporciones de 0.1, 0.5 y 1% de E171, como mecanismo del desarrollo espermático.
- Evaluar la composición de colágeno mediante cuantificación de hidroxiprolina en testículos de ratones con dieta control y proporciones de 0.1, 0.5 y 1% de E171.
- Evaluar histológicamente los epidídimos de ratones control y con dieta de 0.1, 0.5 y 1% de E171.

## 5- MATERIALES Y MÉTODOS

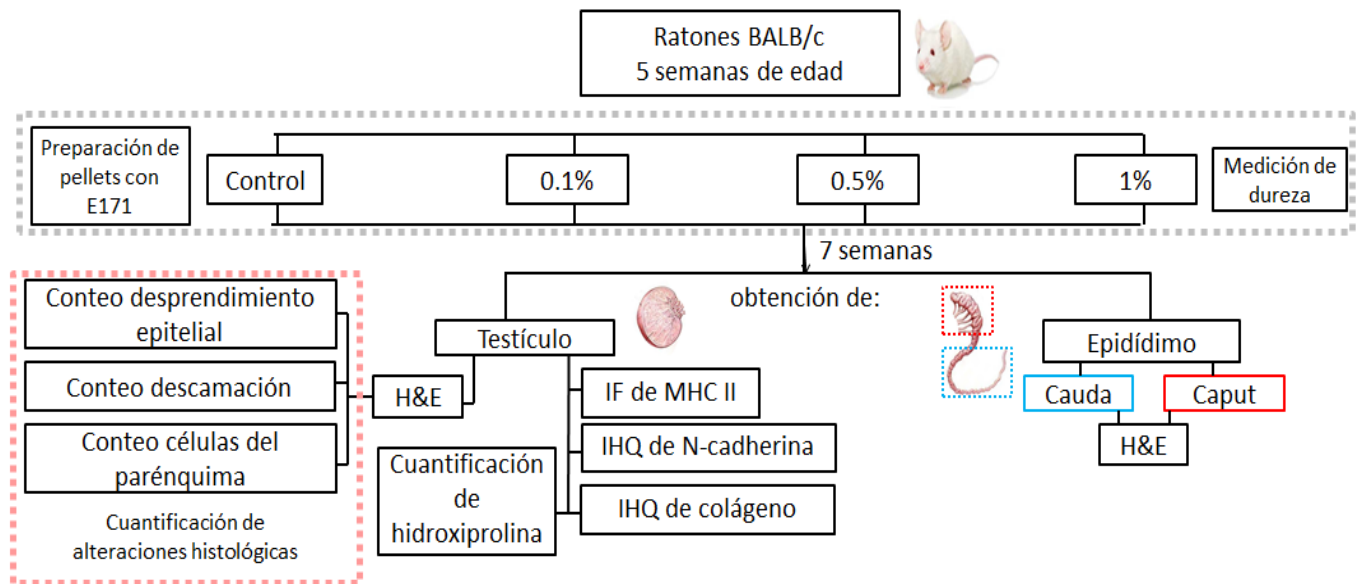
**5.1- Preparación de alimento de ratón con E171 y medición de dureza.** Utilizando Alimento Envigo, Teklad Global Rodent Diets 2016 (16.4% proteína, 4% grasa, <20mg/kg de Isoflavona) preparar 4 tandas de 200g de alimento para cada tipo de dieta. Moler el alimento, agregar un volumen proporcional de agua pura y mezclar de manera uniforme. Moldear de forma cilíndrica con radio de 1 cm y compactar al máximo sin dejar burbujas de aire, moldeados los pellets hornear a 65°C durante dos días y guardar de manera hermética hasta su distribución. Para los pellets al 0.1% de E171 pesar 0.2g de E171 y 199.8 g de alimento, para los pellets de 0.5% de E171 pesar 1g de E171 y 199 g de alimento y para los pellets de E171 al 1% pesar 2g de E171 y 198 g de alimento, mezclando siempre el alimento seco con el polvo de E171 hasta evitar la presencia de grumos de polvo blanco, tal como se realiza en la industria alimenticia; posteriormente seguir el mismo procedimiento que para los pellets control. Para la medición de dureza de los pellets comerciales y preparados utilizar Tablet Hardness Tester (VK200 Varian Benchsaver Series) y realizar la medición de al menos 7 pellets.

**5.2- Caracterización de tamaño y morfología de E171.** La micrografía que muestra el tamaño primario de las partículas de E171 fue obtenido mediante microscopía electrónica de barrido o Scanning Electron Microscopy SEM-JEOL 5800-LV, Japón, usando una magnificación de 5000X y aceleración de electrón de 15 KV.

**5.3- Caracterización de alimento con E171 disperso en fluidos gastrointestinales simulados.** Para la preparación del ácido gástrico simulado añadir 2.91 g de HCl y 2 g NaCl (Sigma Aldrich) a 1 L de agua destilada y ajustando el pH a 1.1. Para preparar el fluido intestinal simulado, añadir 6.8 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.89 g de NaOH a 1 L de agua destilada y ajustar el pH a 6.8. Para medir el tamaño hidrodinámico de la comida adicionada con E171 dispersar en 1 mL del líquido simulado, 1 mg del homogenizado de cada tipo de alimento (0.1, 0.5 y 1%). Determinar el tamaño hidrodinámico, el potencial zeta y el índice de polidispersión usando un Zetasizer NANO ZS (Malvern instruments, UK). En todas las mediciones sonicar previamente a 60Hz por 30 minutos y cada medición realizarla por triplicado.

**5.4. Condiciones y comportamiento de los ratones tratados con E171.** Separar 4 ratones (*Mus musculus*), BALB/c por jaula, con acceso de forma ad-libitum a agua potable, alimento control y con E171. Mantener en camas limpias, condiciones de luz/oscuridad 12 x 12 h, temperatura controlada de 18-26°C y una humedad relativa de 40-70 %. Las consideraciones bioéticas para el cuidado de los animales fueron basadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. En cumplimiento del punto 4.5.1 de dicha norma, todos los animales que se acompañaron de un certificado estableciendo las condiciones de salud y calidad en la que se produjeron, criaron y mantuvieron hasta antes de su empleo. Las jaulas de tamaño 40 X 15 cm y área de 600 cm<sup>2</sup> cumplieron el espacio establecido por la Norma, que indica un mínimo de 75 cm<sup>2</sup> por ratón con peso de entre 15 a 25 g, lo que permitió que no mostraran su capacidad territorial debido a que contaban con el espacio suficiente, durante el estudio observar los cambios en el comportamiento, enfermedad, heridas o muerte.

**5.4.1- Modelo experimental de dieta de alimentación con E171.** Mantener 16 ratones BALB/c de 5 semanas de edad (35 días), de manera aleatoria se separaron en 4 lotes de 4 ratones (n=4), mantenidos con agua y alimentación *ad libitum* durante todo el tratamiento. Se formaron lotes control y tratados con 0.1%, 0.5% y 1% de E171 en la comida, durante 7 semanas, para lo cual se preparó alimento con 0.1%, 0.5%, 1% en peso de E171 añadido antes de cocinar. Se pesaron a los ratones y la cantidad de alimento consumido semanalmente. Al concluirse los tiempos de administración se sacrificaron los ratones obteniendo y pesando los testículos y epidídimos de cada ratón, para continuar con los procesamientos indicados en el esbozo de trabajo mostrado en la Fig. 10.



**Fig. 10 Esquema del modelo experimental.** Se muestran los diferentes grupos de administración, el procesamiento de las muestras y análisis realizados.

**5.5- Procesamiento histológico.** Utilizar el testículo y epidídimo izquierdo para fijación en paraformaldehído al 4% y solución de Bouin durante 18 h, enseguida deshidratar los órganos mediante un carril de alcohol a concentración creciente comenzando con 80%, 90%, 96% y 100% permitiendo la difusión por un tiempo mínimo de 60 min. Para el método de aclaración utilizar una mezcla 1:1 de alcohol 100%-butanol durante 1 h seguido de butanol durante 24 h. Posterior a la aclaración dejar en parafina I durante 12 h, parafina II 1 h, con lo cual se procede a incluir los órganos en parafina a 58°C, vaciar en recipientes metálicos y ubicar la posición anatómica para realizar los cortes histológicos. Realizar los cortes histológicos mediante micrótopo Leica RM2125 RTS®, obtener cortes con un grosor de 5 µm adheridos a portaobjetos lisinizados secados a 40°C.

**5.5.1- Histología con tinción Hematoxilina y Eosina (H&E) en órganos del desarrollo espermático.** En testículos y epidídimos realizar cortes de 5 µm de grosor del tejido en parafina. Desparafinar a 58°C durante 1 h y rehidratar utilizando Xilol I durante 4 min, Xilol II por 4 min, Alcohol-Xilol por 1 min, carril de concentración decreciente de etanol; enjuagar en etanol a porcentajes de 100%, 90%, 80% y 70% durante 2 min cada uno. Enjuagaron en agua de grifo las muestras durante 3 min, sumergir en hematoxilina por 3 min y observar al microscopio la correcta tinción nuclear para posteriormente enjuagar en agua corriente durante 5 min, alcohol ácido por 15 segundos, enjuagar en agua corriente durante 1 min, sumergir en eosina 4 min y revisar la correcta tinción citoplasmática. Enjuagar con agua corriente 3 min y realizar la posterior deshidratación utilizando etanol a concentración creciente comenzando con 70%, 80%, 90% y 100%, Alcohol-Xilol 3 min, Xilol I 5 min y Xilol II 5 min para finalmente conservar las muestras de manera permanente con Entellan®.

**5.5.2- Histología con tinción Tricrómica de Masson en órganos del desarrollo espermático.** Rehidratar los cortes de testículo de 5 µm de grosor utilizando enjuagues en Xilol I durante 4 min, en Xilol II por 4 min, después Alcohol-Xilol por 1 min y etanol a concentraciones decrecientes comenzando con 100%, 90%, 80%, 70% durante 5 min cada uno, posteriormente se enjuaga en agua 3 min, solución Bouin a 56°C 1 h, enjuagar con agua corriente 5 min, teñir sumergiendo en Hematoxilina de Weigert 5 min, posteriormente enjuagar en agua corriente durante 5 min, proseguir la tinción con Rojo escarlata durante 1 min, enjuagar 5 min con agua corriente, continuar con ácido fosfotungstico/ fosfomolibdico por 3 min, teñir con azul anilina por 3 min, ácido acético glacial durante 1 min y concluir con la deshidratación mediante etanol de concentración creciente comenzando con 70%, 80%, 90% y 100%, Alcohol-Xilol 3 min, Xilol I durante 5 min y Xilol II durante 5 min para finalmente conservar las muestras de manera permanente con Entellan®.

**5.6- Análisis histológico mediante cuantificación de alteraciones tisulares.** De cada testículo obtener al menos tres secciones transversales completas. El criterio de inclusión es identificar de manera repetida la misma arquitectura celular en las diferentes secciones, verificando así que las alteraciones morfológicas fueran inherentes al tejido y no a algún artefacto histológico. Las alteraciones histológicas presentes en los túbulos seminíferos fueron el desprendimiento epitelial, caracterizado por la separación de parte del epitelio germinal de la base del túbulo seminífero, manteniendo las espermatogonias en la membrana basal, además de la descamación de células germinales, caracterizado por la pérdida de grupos o hileras de células germinales en cualquier etapa de desarrollo. Para cuantificar se tomaron fotos con aumento de 40X y se evaluaron las alteraciones dentro de los túbulos seminíferos completos. Cuantificar el porcentaje de alteraciones presentes en la cantidad total de túbulos en 8 fotos, cuantificación realizada por triplicado para cada individuo, tomando en total 24 fotos por ratón. Determinar el número de células en el parénquima mediante la cuantificación de los núcleos presentes en 50 fotos al 100X de parénquimas delimitados por tres túbulos seminíferos completos sin considerar capilares sanguíneos.

**5.7- Evaluación de proceso inflamatorio por detección de la expresión de MHC II.** Mediante inmunofluorescencia evaluar la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad II, MHC II al ser identificado en secciones de 3  $\mu\text{m}$  de grosor. Para identificar al epítotope correspondiente a MHC-II, rehidratar las secciones de testículos utilizando Xilol I durante 3 min, Xilol II por 3 min, Alcohol-Xilol por 1 min, etanol con concentración decreciente de comenzando con 100%, 90%, 80% y 70% 2 min cada uno. En lavar con agua corriente por 2 min, PBS 5 min. Recuperar los antígenos por calor en olla de presión con buffer de EDTA alcalino (DIVA) para posteriormente permeabilizar con PBS-Triton 0.5% durante 10 min y bloquear con BSA 1% durante 2 h. Tras tres lavados con PBS durante 5 min, incubar con el anticuerpo primario acoplado a fluroforo (MHC II, dilución 1:200, Biolegend, Cat. 107606). Finalmente, lavar las muestras 5 min con PBS y montar con Entellan® para su preservación y análisis mediante microscopia confocal de campo claro (Confocal Microscope Leica TCS SP8, Germany).

**5.8- Integridad de BHT al evaluar la expresión N-cadherina y colágeno I.** Mediante inmunohistoquímica evaluar la expresión de N-cadherina y COL1A1. Rehidratar secciones de 3  $\mu\text{m}$  de grosor utilizando Xilol I durante 3 min, Xilol II 3 min, Alcohol-Xilol 1 min, carril de concentración decreciente de alcohol comenzando con 100%, 90%, 80%, 70% 2 min cada uno. Enseguida lavar las muestras con agua corriente durante 2 min y enjuagar con PBS 5 minutos. Recuperar antígenos por calor en olla de presión con buffer de EDTA alcalino durante 30 min, para posteriormente permeabilizar con PBS-Triton 0.5% durante 10 minutos y bloquear con BSA 1% durante 2 h. En seguida lavar las muestras 3 veces con PBS por 5 min y posteriormente incubar con el anticuerpo primario (N-cadherina, dilución 1:350, BioLegend, Cat. 844702) y (COL1A1, dilución 1:500, Boster, Cat. PA2140-2). Realizar el revelado con la mezcla de diaminobenzidina 1:20 v/v, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% y PBS volumen final 1mL, durante 5 min. Realizar tres experimentos independientes y los controles negativos se realizaron excluyendo el anticuerpo primario.



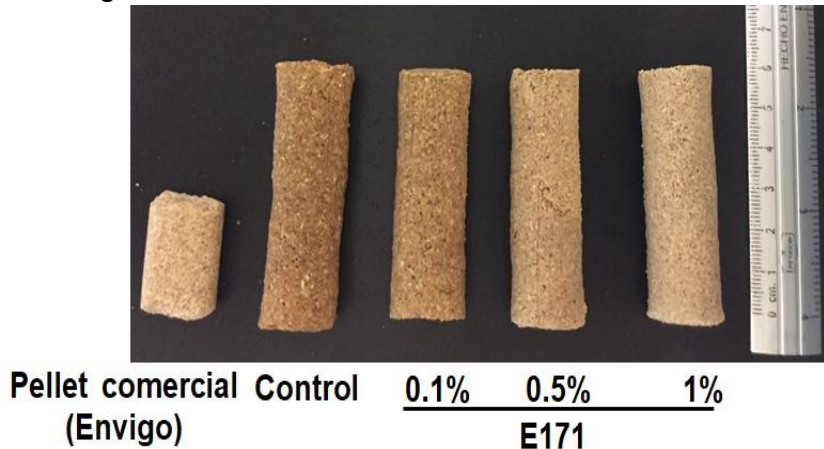
**5.9- Cuantificación de hidroxiprolina asociada síntesis de colágeno.** Suspender tres secciones transversales de testículo en 50 µL de HCl concentrado (~12M) usando un criovial el tejido fue hidrolizado a 120°C por 1 h. Enseguida centrifugar los crioviales a 10,000 g por 3 min y utilizar el sobrenadante para la cuantificación de la hidroxiprolina mediante el KIT Biovision K555. Realizar una curva de concentración conocida de hidroxiprolina e incubar a 60°C por 90 min tanto la muestra para la curva como las muestras. Determinar la absorbancia con el EPOCH a una longitud de onda de 560 nm.

#### **5.10- Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos del monitoreo de los ratones graficar utilizando el software Prism 6 (GraphPad), los análisis cuantitativos de alteraciones histológicas, el conteo de células del parénquima, las semicuantificaciones de las inmunohistoquímicas y la cuantificación de hidroxiprolina entre los diferentes grupos. Como los análisis presentaron una distribución normal, comparar utilizando análisis de varianza ANOVA de una vía, mostrando las barras de media ± error estándar. Realizar la prueba de comparaciones múltiples Dunnet para determinar diferencias entre medias. Las diferencias significativas entre los tratamientos y los controles se consideraron con un significancia estadística igual o menor de \* $p < 0.05$ .

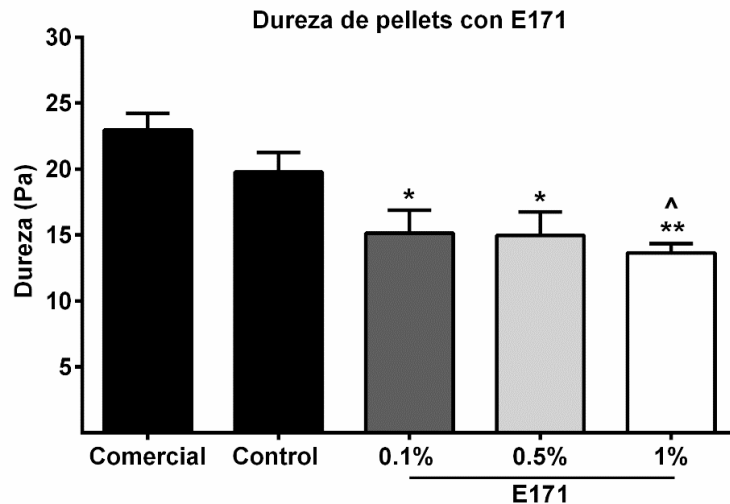
## 6. RESULTADOS

**6.1- Apariencia del alimento sin y con E171:** El color de los pellets comerciales muestran su color café claro característico. En el pellet control se puede observar el efecto que genera el re-horneado y como el E171 es capaz de brindar un color blanco directamente proporcional a la cantidad agregada aumentando el color blanco conforme aumenta la cantidad de E171 como se observa en la Fig. 11.



**Fig. 11. Tamaño, forma y color de alimento preparado sin y con E171.** Apariencia de pellet comercial, color café del pellet control evidenciando el proceso de re-horneado y pellets preparados con 0.1%, 0.5% y 1% de E171 adicionado muestran efecto concentración dependiente del E171 en el color blanco del pellet.

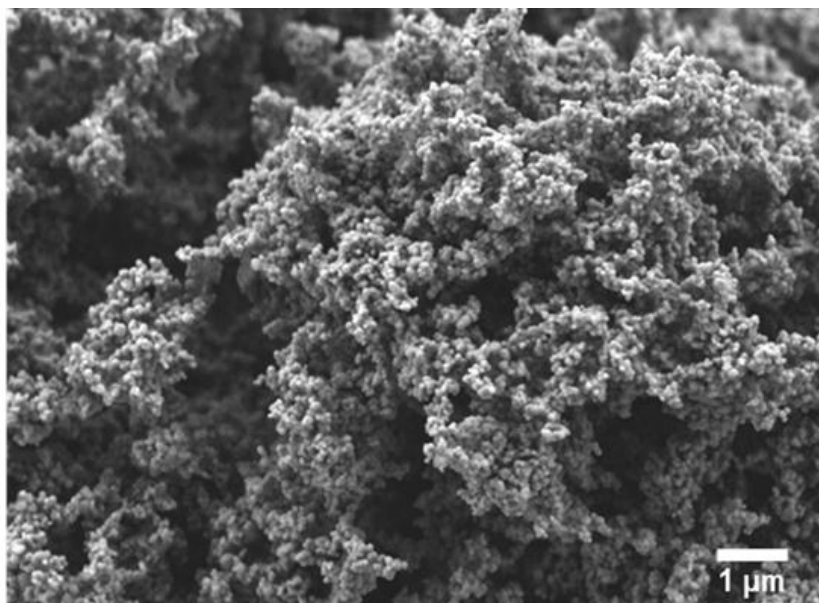
**6.2- Valoración de la dureza de pellets sin y con E171:** Los resultados mostraron que la dureza del alimento preparado disminuye al ser agregado el E171, en cantidades de 0.1, 0.5 y 1% la dureza disminuye significativamente más de una cuarta parte respecto al pellet comercial, es decir más de cinco pascales. Solo la dureza de los pellets de 1%, disminuyen su dureza de manera significativa respecto al pellet control re-horneado observado en Graf. 1.



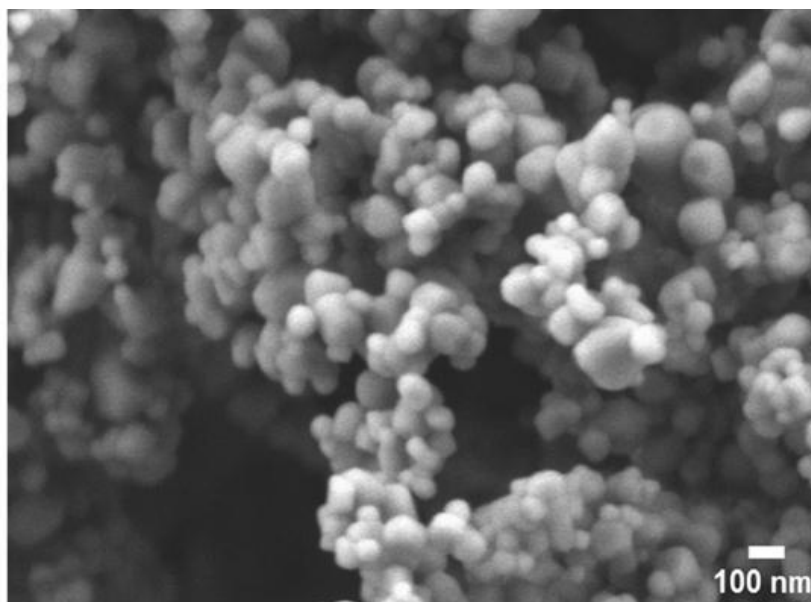
**Graf. 1. Dureza de pellets medida en pascales:** Medición de  $n \leq 7$ , Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes, se muestra error estándar  $\pm$ , disminución significativa de dureza en \* =  $p < 0.05$  vs Pellet comercial, \*\*  $p < 0.01$  vs Pellet comercial, ^  $p < 0.05$  Dunnett vs Control.

**6.3- Caracterización del tamaño y forma del polvo seco de E171 mediante microscopía electrónica de barrido:** La imagen de microscopía electrónica de barrido muéstralos agregados de tamaño micrométrico en la Fig. 12, A y los diferentes tamaños de las partículas de E171 que poseen un tamaño por debajo y por encima de los 100 nm y generan agregados por encima del tamaño nanométrico o micrométrico con morfología amorfa, como se observa en ambos paneles de la Fig. 12, B.

**A**



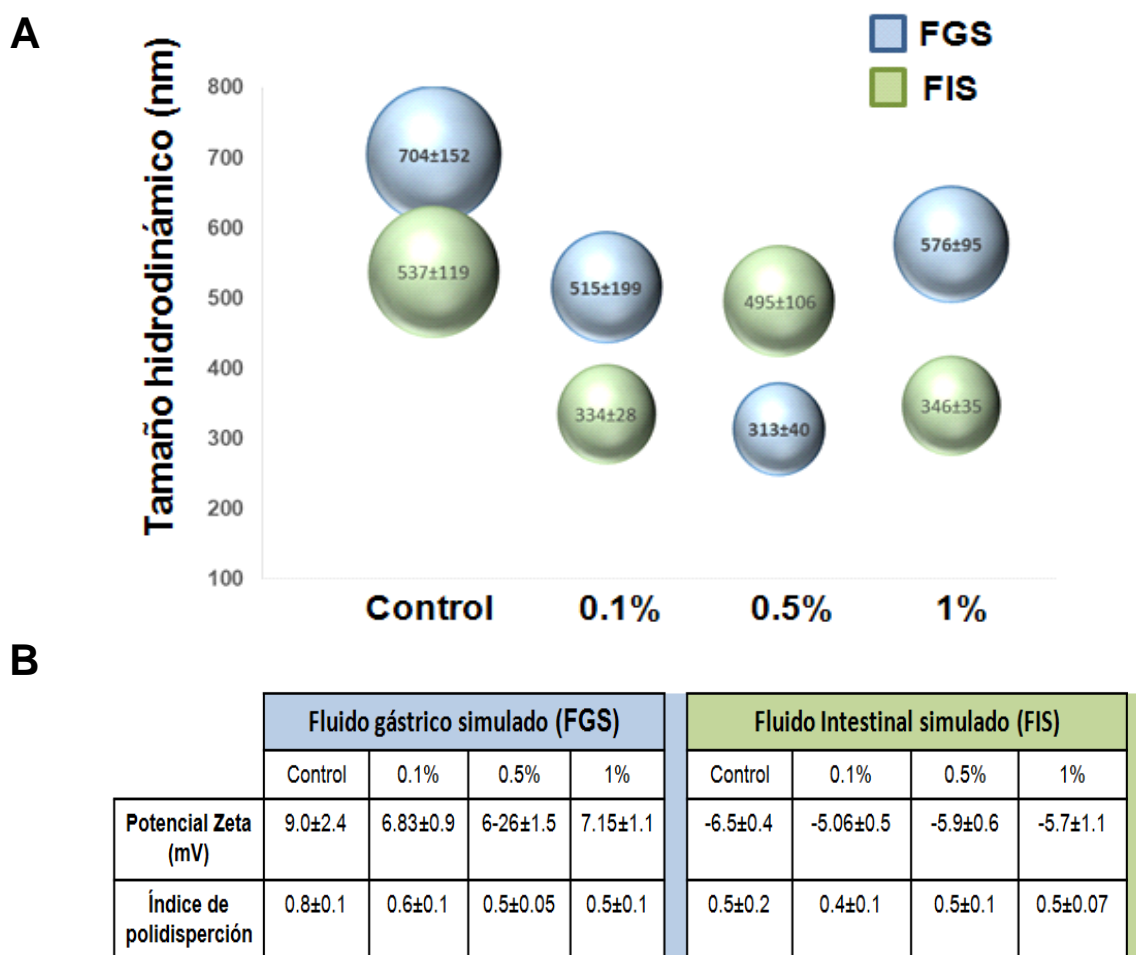
**B**



**Fig. 12. Microscopía electrónica de barrido de E171 evaluando tamaño y morfología en su forma seca:** A) Agregado micrométrico de partículas de E171 observadas por microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés).B) Observación de partículas de tamaño por encima y por debajo de los 100 nm y morfología primaria amorfa de partículas de E171

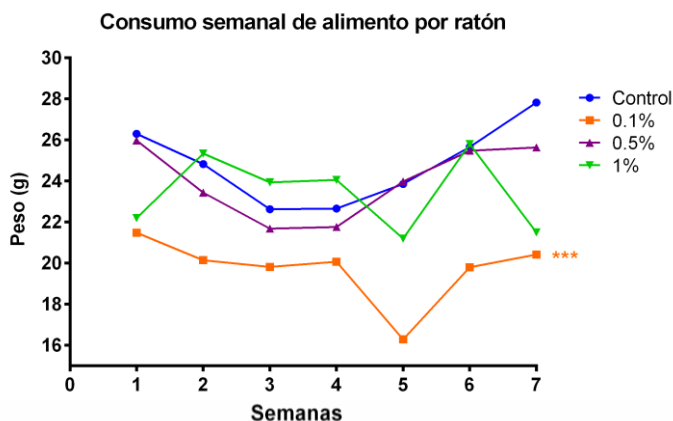
#### 6.4- Caracterización del alimento sin y con E171 en medios gastrointestinales simulados:

Disperso el alimento sin E171 y con E171 en fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS) se midió por medio de dispersión de luz el tamaño de los agregados que estos generan en cada fluido. Los tamaños de agregados representados en la Fig. 14, A, determinan el tamaño hidrodinámico del alimento sin y con E171 en los fluidos simulados. Los tamaños de agregados son mayores en ambos fluidos cuando no hay partículas de E171. La presencia de E171 genera agregados que van desde los 273 nm a 671 nm en FGS y de los 306 nm a 601 nm en FIS siendo ligeramente más pequeños los agregados en fluido intestinal, excepto en 0.5% Fig. 13 B. El potencial Zeta para los agregados en FGS determinó partículas con carga positiva asociadas a pH ácido y de partículas con carga negativa en FIS asociado a pH básico como se ve en la Fig. 13, B. El qué tan variadas son las partículas se determina mediante el índice de polidispersión, que determina un mismo tamaño entre partículas mientras más cercano sea a cero. Los índices de polidispersión de cada alimento muestran un comportamiento similar entre agregados de partículas aún en FIS o FIG, valores cercanos a 0.5, indican que hay variación en el tamaño de las partículas que lo componen.



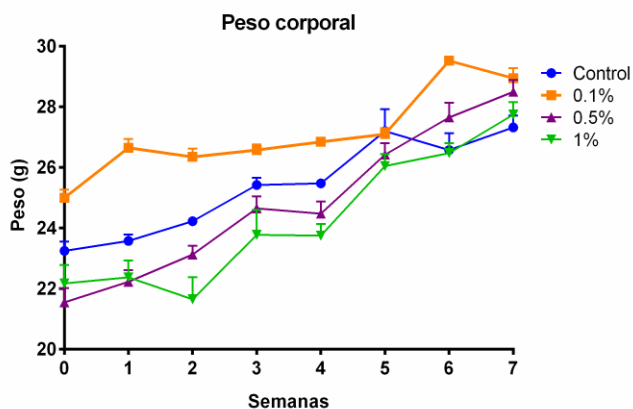
**Fig. 13. Determinación de la distribución de tamaños de agregados en fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS):** A) Datos del rango de tamaños nanométricos de los agregados hidrodinámicos del alimento y el alimento con E171 en FGS y FIS. B) Potencial Zeta e Índice de polidispersión obtenidas por dispersión dinámica de luz del alimento con E171 a 0.1%, 0.5%, 1% del peso del alimento en fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado. Representación del rango de tamaños hidrodinámicos encontrados en cada una de las diferentes muestras de E171 de la tabla.

**6.5- Valoración del consumo semanal de alimento por animal durante el tratamiento:** La cantidad de alimento ingerida se midió pesando la diferencia entre cantidad de alimento agregado y sobrante, de manera semanal observada en la Graf. 2. Entre los diferentes grupos el consumo de alimento con E171 no fue significativamente diferente entre todas las dietas respecto al grupo control excepto los de dieta a 0.1% durante casi todas las semanas. Los valores en peso de dieta control fueron variando de 22.6g a 27.8g en los ratones control, de 16.2g a 21.4g en los ratones alimentados con 0.1% de E171, de 21.68g a 25.9g en los ratones alimentados con 0.1% de E171 y de 21.2g a 25.8g en los ratones alimentados con 1% de E171.



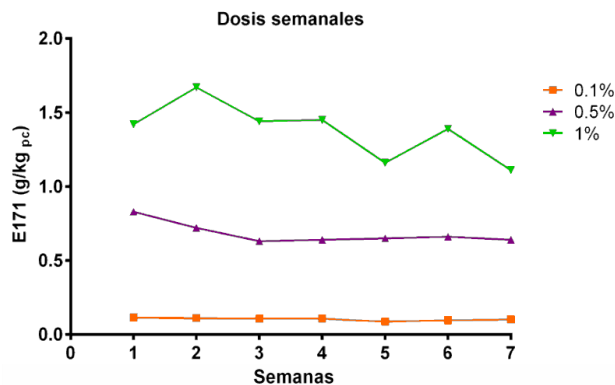
**Graf. 2. Monitoreo del alimento consumido semanalmente por los ratones alimentados con E171:** Mediciones del peso semanal del alimento consumido por los diferentes grupos, n=1, disminución significativa en \*\*\*  $p < 0.001$  vs Control, Dunnett.

**6.6- Monitoreo semanal de los pesos de animales alimentados con E171:** Los pesos de los animales de manera semanal muestran un aumento de peso sin cambios significativos entre tratamientos y controles, resultados observados en la Graf. 3. Mostrando un aumento de peso progresivo desde los 21-24 g hasta los 27-29 g durante las siete semanas.



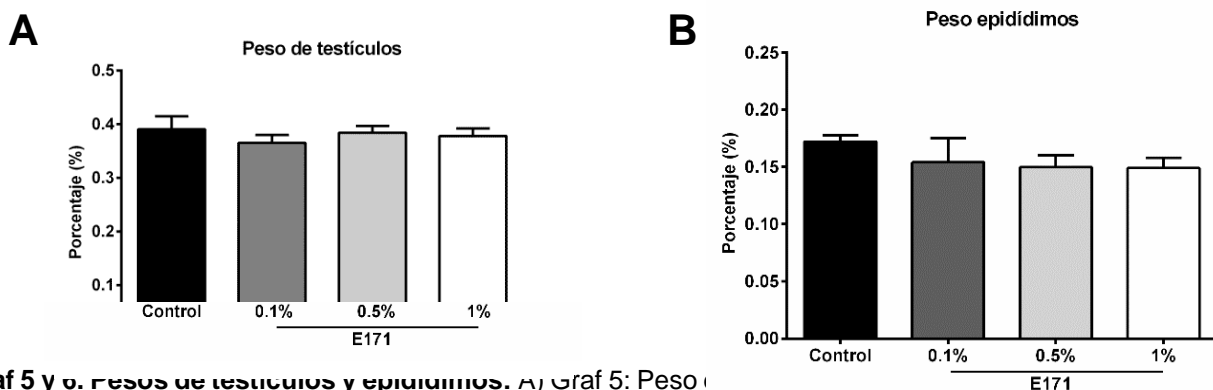
**Graf. 3. Monitoreo del peso corporal de animales que consumieron alimento con E171:** A) Peso semanal promedio por ratón durante las siete semanas de dieta. Prueba de Dunnett para observar diferencia entre medias.

**6.7- Estimación de dosis semanal consumida durante el estudio:** Con base en la cantidad de alimento consumido y la cantidad proporcional de E171, se calculó la dosis semanal de cada grupo de dieta. Estimándose cantidades entre 0.08-0.11g/kg<sub>pc</sub> al día para los ratones con dieta al 0.1%, entre 0.63 y 0.883 g/kg<sub>pc</sub> al día para aquellos con dieta de 0.5% y entre 1.11-1.67 g/kg<sub>pc</sub> al día para los de dieta al 1% como se observa en la Graf. 4. Siendo así el grupo de 0.1% el que menos consume y siendo la dosis de los grupos de 0.5% y 1%, 5 y 10 veces mayor que los de 0.1% respectivamente.



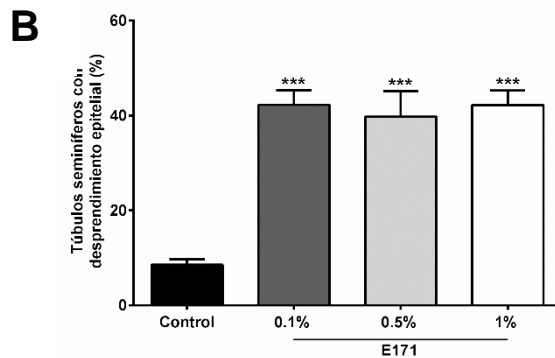
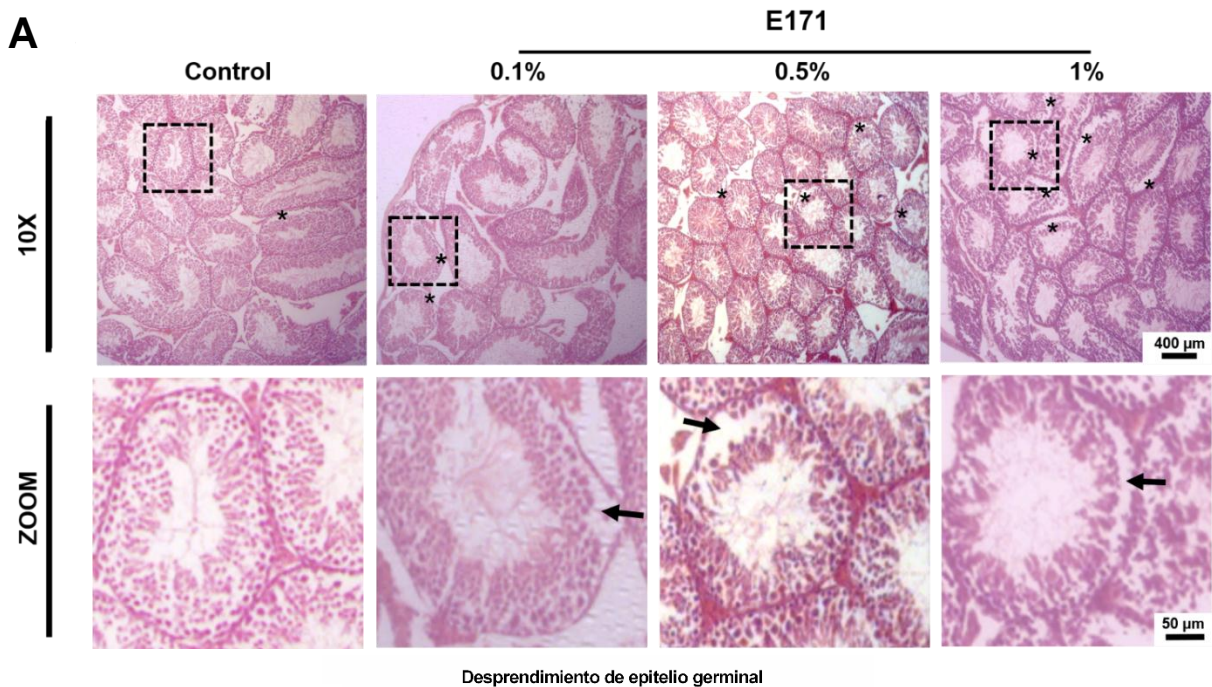
**Graf 4. Dosis de consumo estimadas semanalmente:** Estimación con base en peso y consumo de alimento semanal. Color naranja 0.1%, color morado 0.5% y color verde 1%.

**6.8- Evaluación del peso de órganos:** Se determinó el peso porcentual de los testículos recién obtenidos con respecto al peso corporal, no se encuentran diferencias dentro de los rangos obtenidos. Un rango entre 0.34% y 0.45% para los ratones control, entre 0.32% y 0.39% para los ratones con 0.1%, entre 0.35% y 0.41% para los ratones con 0.5% y entre 0.36% y 0.41% para los ratones con 1%, lo resultados se muestran en la Graf 5. El peso porcentual con respecto al peso corporal de los epidídimos recién obtenidos se encuentra en un rango entre 0.15% y 0.18% para los ratones control, entre 0.11% y 0.21% para los ratones con 0.1%, entre 0.13% y 0.18% para los ratones con 0.5% y entre 0.13% y 0.17% para los ratones con 1%, valores mostrados en la Graf. 6. No se muestran cambios significativos en el peso de los órganos reproductivos como consecuencia de la dieta a las diferentes cantidades de E171.



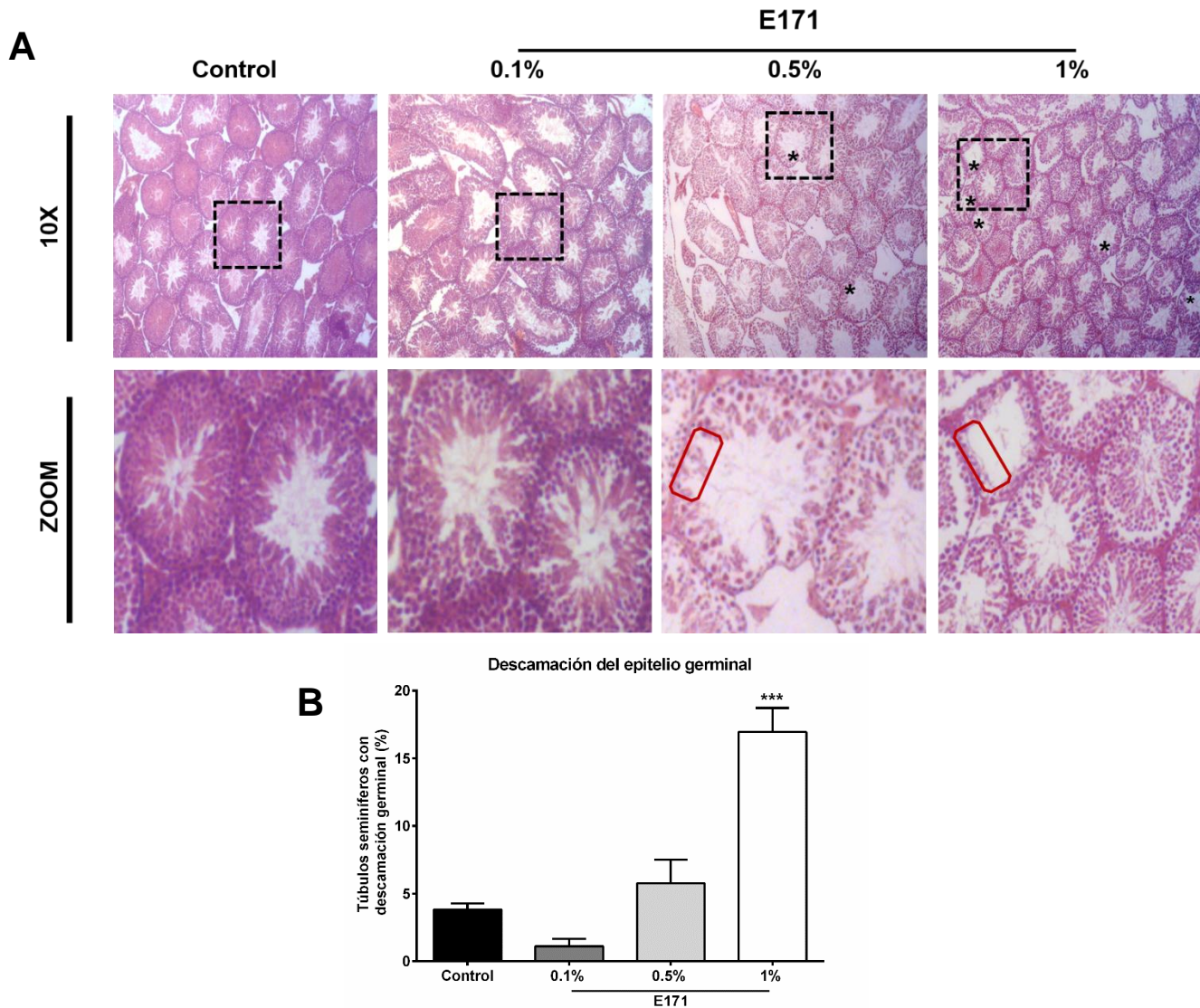
**Graf 5 y 6. Pesos de testículos y epidídimos.** A) Graf 5: Peso de testículos entre los grupos con diferentes dietas. B) Graf 6: Peso de epidídimos no muestran diferencias significativas entre los grupos con diferentes dietas. Los datos se expresan como media ± error estándar de al menos cuatro experimentos independientes, prueba de Dunnet para observar diferencia entre medias.

**6.9- Desprendimiento de epitelio germinal como efecto de alimentación con E171:** De cada testículo se obtuvieron al menos tres secciones de cortes histológicos transversales completos, evidenciando que la morfología es inherente a las condiciones del tejido al repetirse la misma arquitectura en todas las secciones. El desprendimiento germinal es la separación del epitelio germinal de la membrana basal (MB) de los TS. En la Fig. 14, A, los asteriscos indican la zona con desprendimiento de epitelio germinal a la MB. Para evaluar el porcentaje del desprendimiento epitelial y descamación de células germinales entre los diferentes grupos de dieta, se contaron las alteraciones histológicas presentadas en la Tabla 2. El análisis estadístico se realizó en más del 60% del área de la sección transversal. Se muestran diferencias significativas de desprendimiento de epitelio germinal entre los ratones control y todos los grupos con dieta de E171 indicadas en la Fig. 14, B.



**Fig. 14. Determinación y cuantificación del desprendimiento del epitelio germinal de túbulos seminíferos:** A) Histología de control muestra la arquitectura íntegra del epitelio germinal en testículo, con asteriscos (\*) en 0.1%, 0.5% y 1% la flecha ubica la zona de desprendimiento del epitelio germinal de la MB B) Cuantificación en porcentaje del desprendimiento epitelial realizada en tres laminillas por ratón y 4 ratones por tratamiento, datos muestran media  $\pm$  error estándar, aumento significativo en \*  $p < 0.05$  vs control, \*\*\* $p < 0.001$  vs control. Prueba de Dunnet para observar diferencia entre medias.

**6.10- Descamación de células germinales como efecto de altas cantidades de E171:** El conteo de túbulos con descamación se hizo paralelo al conteo de desprendimiento de epitelio, determinando como descamación a la pérdida de grupos o capas de células germinales en una o más de sus etapas. Los cuadrados con líneas punteadas indican las zonas de zoom de áreas representativas en donde se encuentra la descamación de células germinales, señalados en la Fig. 15, A, con un aumento de 10X. La descamación es significativamente mayor en los ratones con dieta de 1% respecto al control aumentando más de 10%, como se muestra en la Fig. 15, B, y presentando pérdida de Sd, Sc e incluso Sg, tal como se ve en los rectángulos rojos del ZOOM en la figura 15, A.



**Fig. 15. Determinación y cuantificación de la descamación de células germinales de descamación del epitelio germinal:** Histología de grupos control y 0.1% muestran túbulos seminíferos con epitelio germinal íntegro; 0.5% y 1% muestras TS con descamación señalados con asteriscos (\*), aumento 10X. Zoom muestra las zonas delimitadas con los recuadros punteados negros. Se indican las zonas con descamación de células germinales señaladas con recuadros rojos. B) Cuantificación en porcentaje de TS con descamación de células germinales, realizada en tres laminillas por ratón y 4 ratones por tratamiento, datos muestran media  $\pm$  error estándar, aumento significativo en \*  $p < 0.05$  vs control, \*\*\*  $p < 0.001$  vs control. Prueba de Dunnett para observar diferencia entre medias.



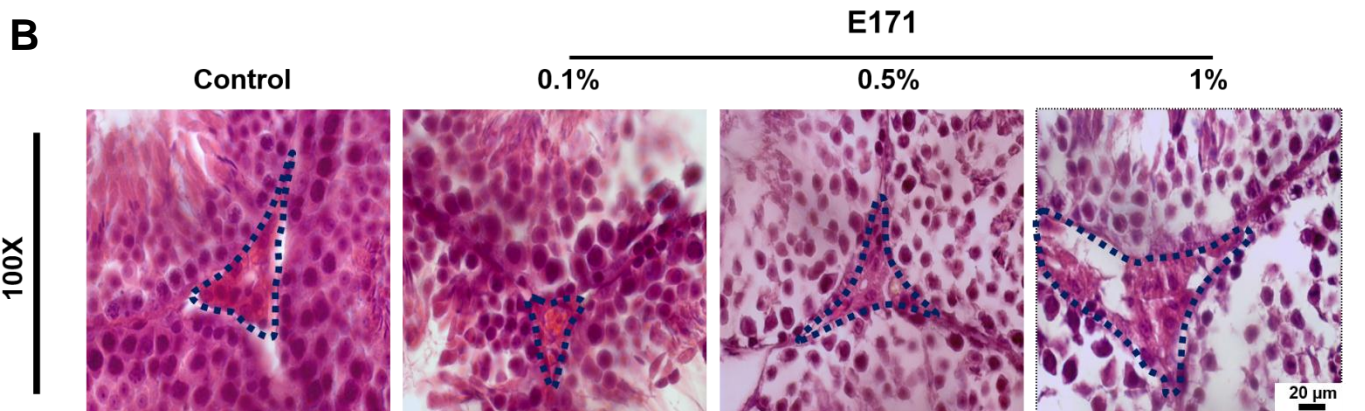
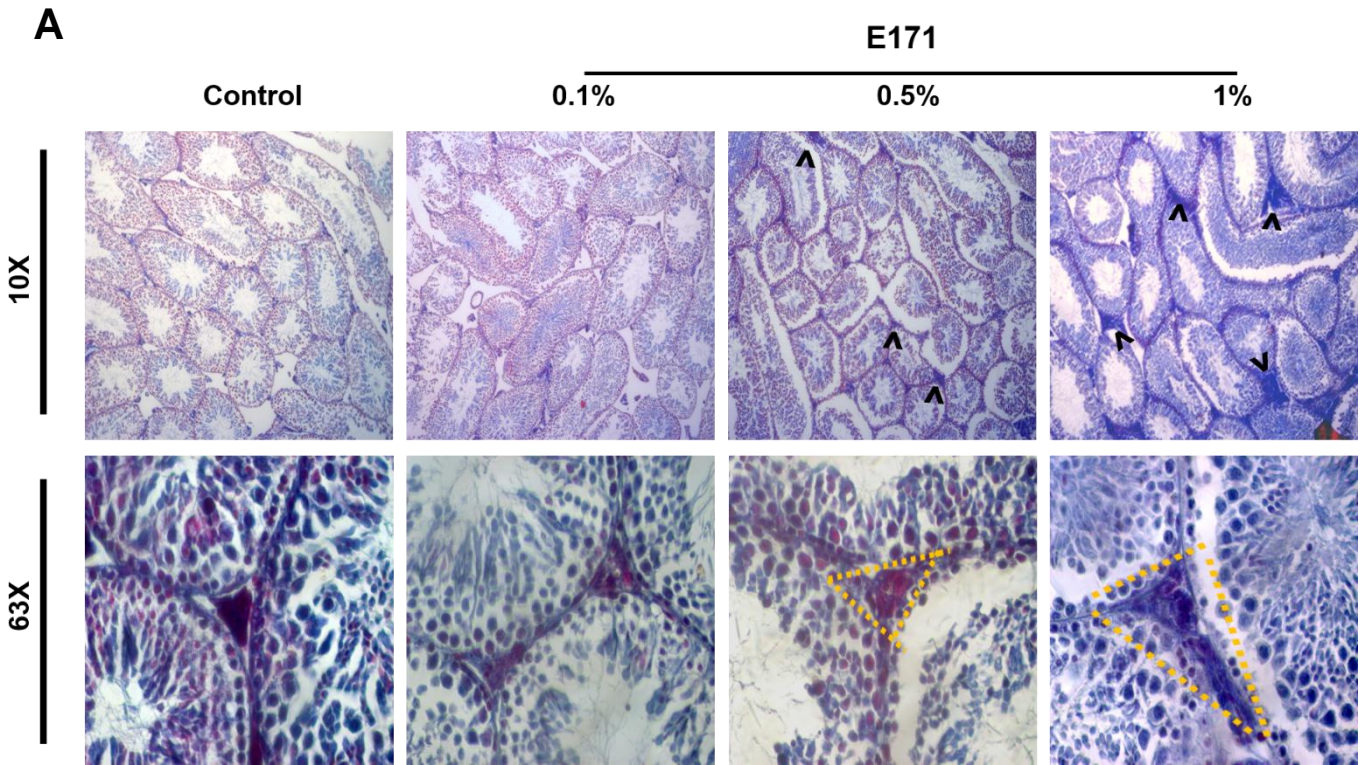
- **Conteo de túbulos seminíferos y alteraciones histológicas.**

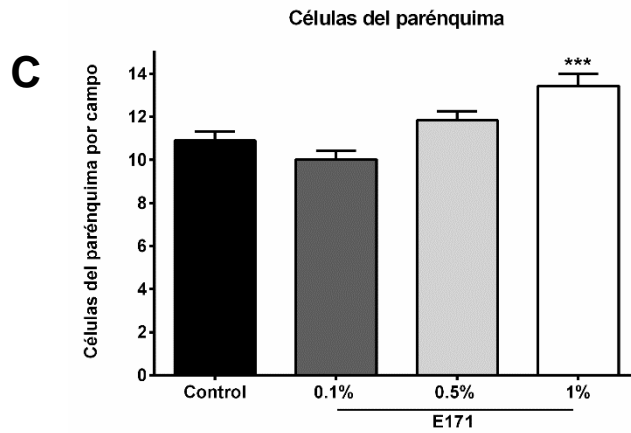
<b>Dieta</b>	<b>TS normales</b>	<b>Desprendimiento epitelial</b>	<b>Descamación germinal</b>	<b>Total TS</b>	<b>Desprendimiento %</b>	<b>Descamación %</b>
<b>Ct I</b>	22	7	0	29	24.13	0
	28	13	0	41	31.70	0
	20	9	0	29	31.03	0
<b>CT II</b>	22	9	0	31	29.03	0
	22	5	0	27	18.51	0
	26	6	0	32	18.75	0
<b>Ct III</b>	43	7	0	50	14	0
	38	8	1	47	17.02	2.12
	42	4	1	47	8.51	2.12
<b>Ct IV</b>	22	4	1	27	14.81	3.70
	23	5	1	29	17.24	3.44
	27	8	1	36	22.22	2.77
<b>0.1% I</b>	22	18	0	40	45	0
	24	18	0	42	42.85	0
	21	18	0	39	46.15	0
<b>0.1% II</b>	11	17	0	28	60.71	0
	13	19	0	32	59.37	0
	14	15	0	29	51.72	0
<b>0.1% III</b>	35	18	0	53	33.96	0
	34	18	1	53	33.96	1.88
	36	20	2	58	34.48	3.44
<b>0.1% IV</b>	22	13	2	37	35.13	5.40
	23	12	1	36	33.33	2.77
	32	14	0	46	30.43	0
<b>0.5% I</b>	14	26	1	41	63.41	2.43
	9	19	1	29	65.51	3.44
	5	20	1	26	76.92	3.84
<b>0.5% II</b>	16	6	6	28	21.42	21.42
	17	5	2	24	20.83	8.33
	13	8	3	24	33.33	12.5
<b>0.5% III</b>	27	10	0	37	27.02	0
	22	13	1	36	36.11	2.77
	20	9	2	31	29.03	6.45
<b>0.5% IV</b>	28	11	1	40	27.5	2.5
	19	15	2	36	41.66	5.55
	29	15	0	44	34.09	0
<b>1% I</b>	13	10	5	28	35.71	17.85
	11	10	6	27	37.03	22.22
	18	9	5	32	28.12	15.62
<b>1% II</b>	18	11	7	36	30.55	19.44
	20	10	3	33	30.30	9.09
	14	10	3	27	37.03	11.11
<b>1% III</b>	10	18	5	33	54.54	15.15
	10	15	6	31	48.38	19.35
	5	12	8	25	48	32
<b>1% IV</b>	10	22	5	37	59.45	13.51
	10	19	6	35	54.28	17.14
	17	16	4	37	43.24	10.81

TS: Túbulos seminíferos

**Tabla 2. Tabla de cuantificación de alteraciones histológicas en TS:** Evaluación de túbulos seminíferos en más del 60% del área testicular de secciones transversales completas.

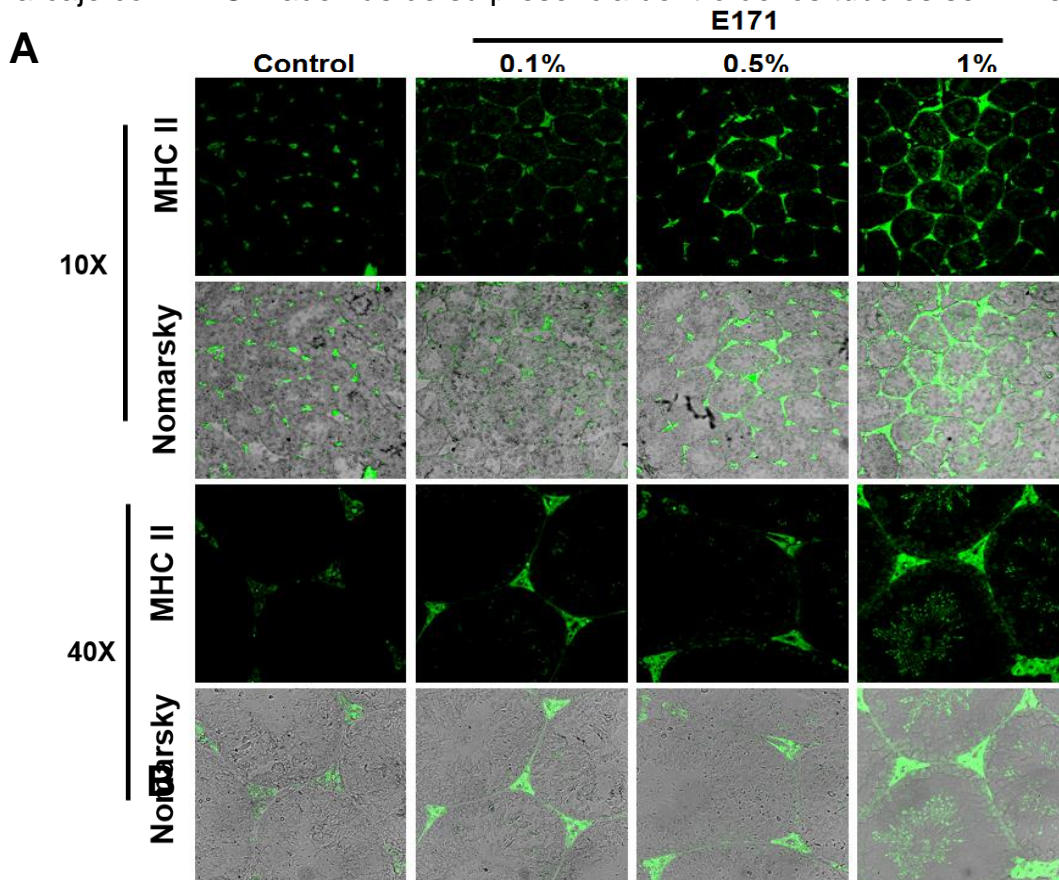
**6.11- Evaluación de la distribución de parénquima testicular:** La tinción Tricrómica de Masson permite diferenciar células del parénquima de los demás tipos de células dentro de los TS, evidenciado por un aumento en el grosor del parénquima (Fig. 16. A). El aumento en el grosor del parénquima evidenciado por un mayor marcaje de las zonas azules es un posible indicativo de infiltración celular a causa de un proceso inflamatorio y mayor presencia de colágeno. Al realizar el conteo de células del parénquima, se cuantificaron únicamente las regiones del parénquima que estuvieran rodeados por tres túbulos seminíferos, tal como se puede observar en las regiones encerradas por los triángulos con líneas punteadas (Fig. 16. B). Se realizó el conteo sin considerar a las células que componen los vasos sanguíneos. Únicamente el grupo correspondiente a la dieta de 1% demostró un aumento significativo de células en esta región (Fig. 16. C).

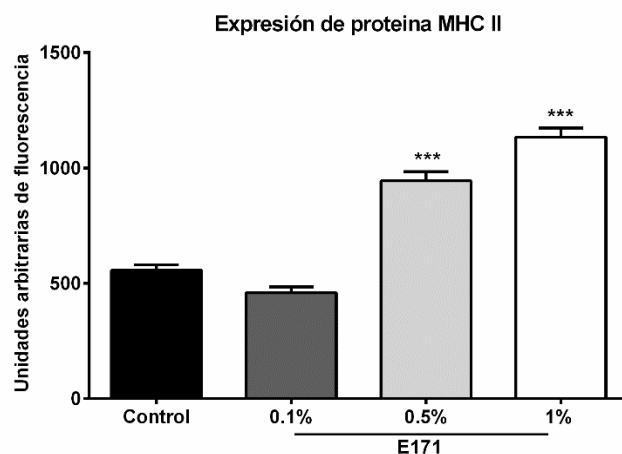




**Fig. 16. Valoración del aumento en el grosor del parénquima y cantidad de células:** A) Las zonas donde se localiza el aumento en el grosor del parénquima se señala con la cruz amarilla en 0.5% y 1%. B) Se muestra parénquima con aumento de 100X, la sección punteada entre tres túbulos seminíferos delimitan la zona de conteo. C) Conteo de células germinales de tres secciones de ratón por dieta, los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar de al menos cuatro ratones, datos muestran media  $\pm$  error estándar, aumento significativo \*\*\*  $p < 0.001$  vs control. Prueba de Dunnet para observar diferencia entre medias.

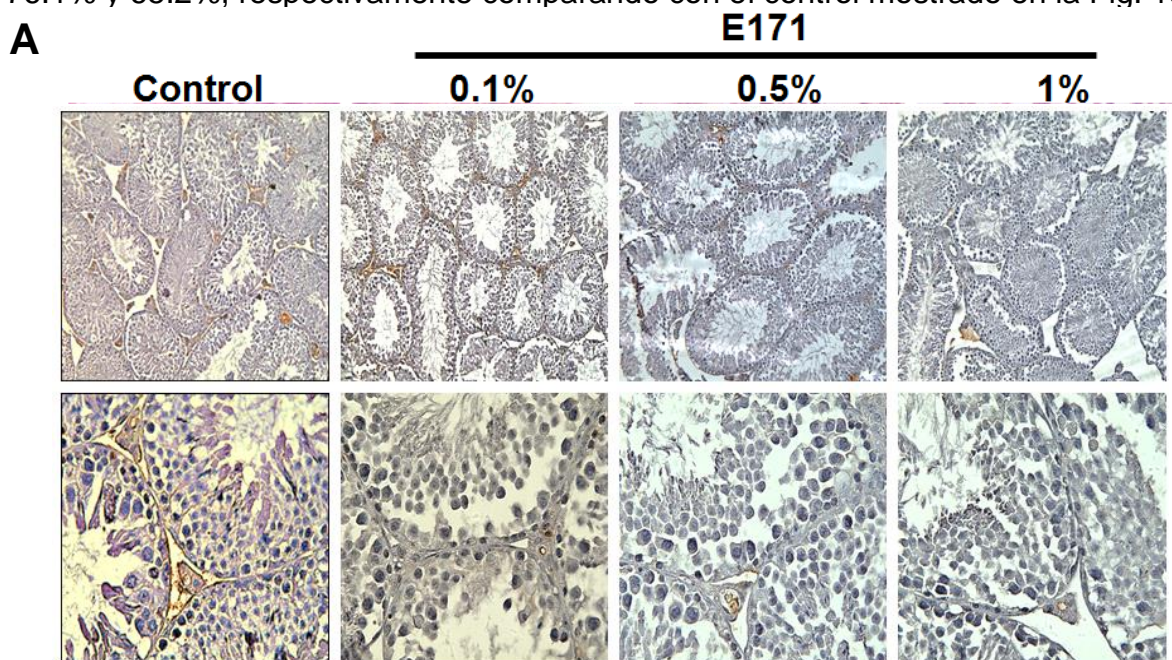
**6.12- Evaluación de proceso inflamatorio al detectar la expresión de MHC II en tejido testicular:** El marcaje de MHC II permite marcar diferentes tipos de células inmunes, tales como macrófagos, células dendríticas o linfocitos. Este tipo de células se encuentran de manera común en el parénquima testicular tal como se puede observar en la Fig. 17, A, con su delimitación celular bien marcada en las imágenes de Nomarsky. La cuantificación en unidades arbitrarias de la expresión de MHC II en el grupo con dieta, no demuestra un aumento de fluorescencia como se observa en la Fig. 17, B, sin embargo, se observa un marcaje en las células del epitelio germinal. Los grupos con dieta de 0.5% y 1% muestran aumento significativo del marcaje con MHC II además de su presencia dentro de los túbulos seminíferos.

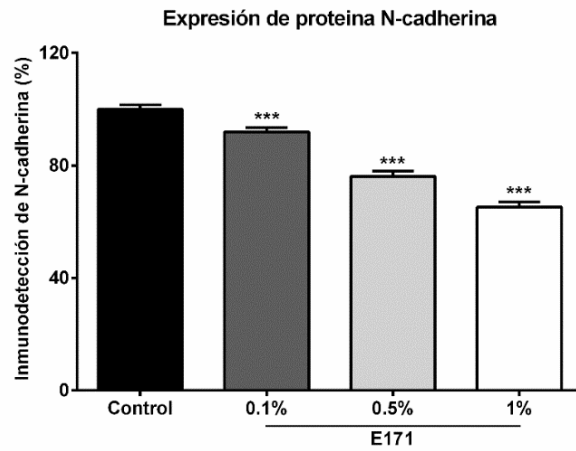




**Fig. 17. Inmunodetección y cuantificación de la expresión de MHC II:** A) Imágenes resrepresentativas del inmunomarcaje contra MHC II a un aumento de 10 y 40X evaluado por microscopía confocal mostrando contraste de fases, Nomarsky evidenciando la delimitación de las células marcadas. B) Cuantificación de fluorescencia en unidades arbitrarias, alteraciones significativas en la expresión de MHC II. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes de cuatro ratones por tratamiento, alteraciones significativas en \*\*\* vs Control  $p < 0.001$ . Prueba de Dunnet para observar diferencia entre medias.

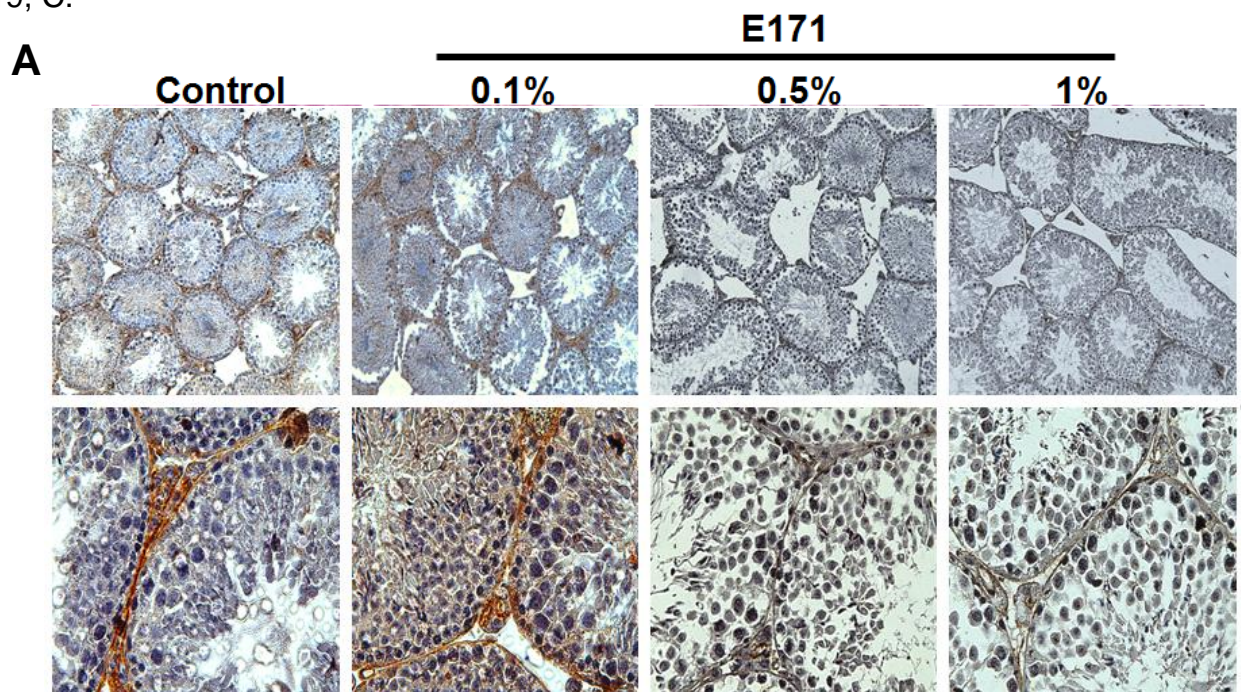
**6.13- Integridad de BHT evidenciada por la expresión de N-cadherina:** La detección de N-cadherina permite identificar la zona donde se encuentra la barrera hematotesticular, marcada en la membrana basal del túbulo seminífero, como se ve en el control mediante el inmunomarcaje por diaminobenzidina tanto en la zona de los túbulos como del parénquima, de toda la sección testicular del control y de los tratados (Fig. 18, A). Al cuantificar el inmunomarcaje de la expresión de N-cadherina con dieta al 0.1% disminuye a un 91.9% respecto al control, como se muestra en la Fig. 18, B. El marcaje disminuye de manera generalizada en las secciones testiculares de los grupos con dieta de 0.5% y 1% disminuye a un 76.1% y 65.2%, respectivamente comparando con el control mostrado en la Fig. 18, A.

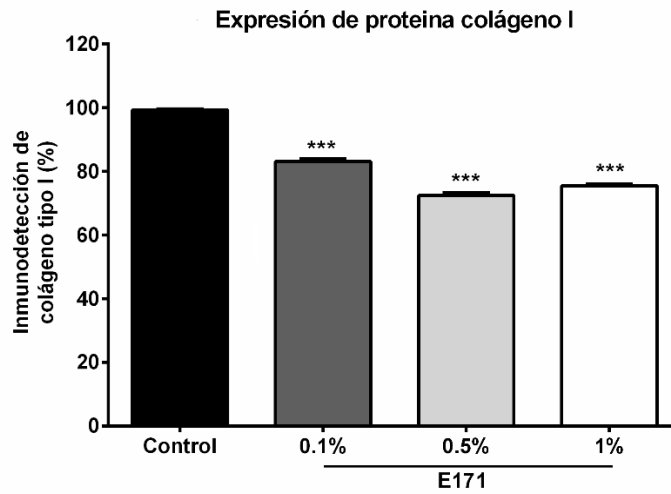
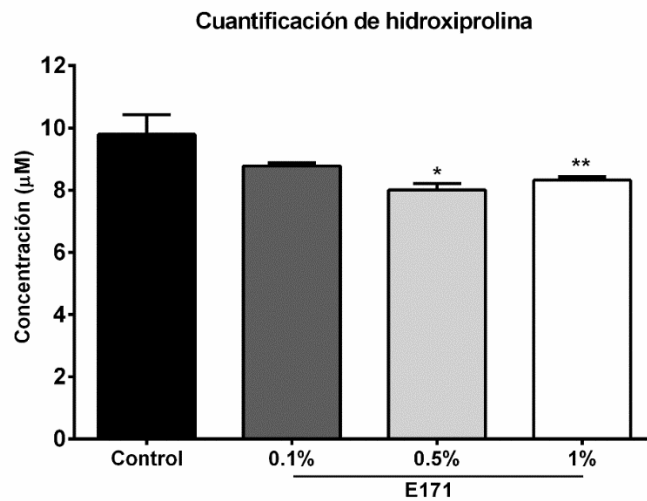




**Fig. 18. Inmunodetección y cuantificación de la expresión de N-cadherina en túbulos seminíferos:** A) Revelado de N-cadherina detectado específicamente por inmunohistoquímica y revelado por diaminobenzidina, expresión color café disminuye en los ratones tratados con E171. B) Cuantificación de inmunodetección por porcentaje de grises, alteraciones significativas en la expresión de N-cadherina de los ratones tratados. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes de cuatro ratones por tratamiento, \*\*\* vs Control  $p < 0.001$ . Prueba de Dunnet para observar diferencia entre medias.

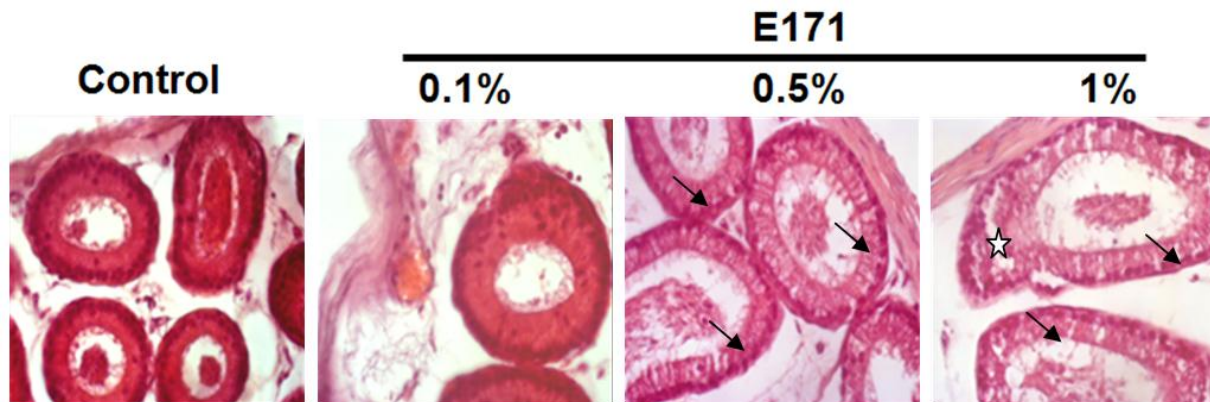
**6.14- Disminución en la expresión de colágeno I y en la concentración de hidroxiprolina como efecto de la alimentación con E171:** La detección de colágeno se localizó dentro de los túbulos, así como en el parénquima tal como se observa en los ratones control, el marcaje se mantiene en el grupo de dieta a 0.1%; mientras que en los grupos de dieta a 0.5% y 1% el marcaje disminuye, especialmente en los ratones con 1% (Fig. 19, A). La cuantificación de la inmunodetección de expresión colágeno disminuye significativamente de manera generalizada en las secciones testiculares de los grupos con dieta con 0.1% a un 69.7%, con 0.5% a 72.3% y con 1% a 75.5%, todas respecto al control mostradas en la Fig. 19, B. La cuantificación de hidroxiprolina de las secciones de testículo para el control y con dieta de 0.1% es de 9.7  $\mu\text{M}$  y 8.7  $\mu\text{M}$  respectivamente. Las secciones testiculares de los grupos con dieta con 0.5% y 1% disminuyeron significativamente a un 8  $\mu\text{M}$  y 8.3  $\mu\text{M}$  respecto al control mostradas en la Fig. 19, C.



**B****C**

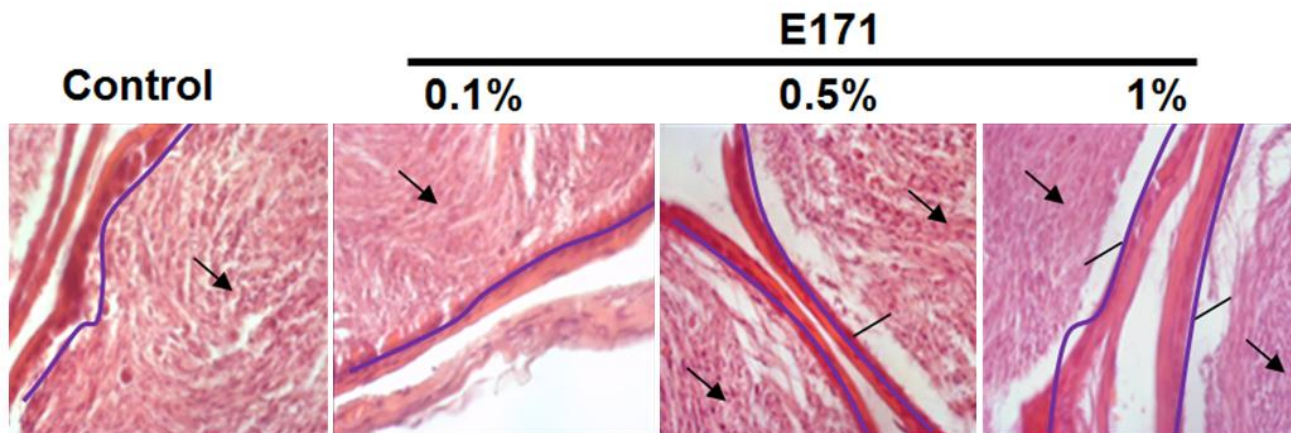
**Fig. 19. Inmunodetección y cuantificación de la expresión de colágeno I e hidroxiprolina en testículo:** A) Revelado de colágeno I detectado específicamente por Inmunohistoquímica y revelado por diaminobenzidina, expresión color café disminuye en los ratones tratados con E171. B) Cuantificación de inmunodetección por porcentaje de grises, alteraciones significativas en la expresión de colágeno I de los ratones tratados con E171, \*\*\* vs Control  $p < 0.001$ . C) La concentración de hidroxiprolina disminuye de manera significativa en ratones alimentados con 0.5% y 1%, \*\* vs Control  $p < 0.01$ , \* vs Control  $p < 0.05$ . Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes de cuatro ratones por tratamiento. Prueba de Dunnet para observar diferencia entre medias

**6.15- Valoración histológica del epitelio de zona caput de epidídimo:** En la Fig. 20, se observa el epitelio normal del epidídimo en la región caput de los ratones control y 1%. Se observó de manera generalizada en toda la región caput un aumento de vacuolas intracelulares además de aumento en la desorganización entre las células del epitelio epididimal de la región caput de ratones con dieta de 0.5 y 1%.



**Fig. 20. Valoración histológica del epitelio de zona caput de epidídimo:** Las flechas señalan el epitelio epididimal de la región caput con vacuolización; la estrella muestra zona de ruptura del epitelio

**6.16- Valoración de la interacción entre espermatozoides y epitelio de zona cauda de epidídimo:** En la Fig. 21 se muestra la membrana basal de color morado y los espermatozoides señalados con flechas. El epitelio normal del epidídimo en la región cauda de los ratones se observa en el control y 0.1% sin alteraciones considerables dentro de las células. Como efecto de la dieta con 0.5% y 1% se observa una disminución generalizada en la pérdida de interacción entre los espermatozoides almacenados en esta zona y el epitelio caudal del epidídimo.



**Fig. 21. Valoración de la interacción entre espermatozoides y epitelio de zona cauda de epidídimo:** El epitelio epididimal se muestra alineado de color morado, Las flechas muestran espermatozoides, el (/) indica la zona de separación.

## 7- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El  $\text{TiO}_2$  grado alimenticio o E171, es un aditivo alimenticio sin valor nutricional del cual no se tiene estimaciones de consumo de la población mexicana. Las afectaciones a nivel respiratorio han generado la incertidumbre de si la exposición vía oral es capaz de generar efectos adversos. El principal objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del E171 administrado en una matriz sólida como generalmente se encuentra en productos alimenticios sólidos, a diferencia de la mayoría de los trabajos reportados que evalúan NPs de  $\text{TiO}_2$  y no E171 además de ser administradas en matrices líquidas. El efecto de éstas en el organismo depende de la forma en la que se dispersen en la matriz extracelular o membrana de la célula y se transloquen dentro de las células de los órganos (DeLoid et al., 2017; Sohal et al., 2018). Por lo que el papel de la matriz que acompaña al E171 en la ingesta oral es importante ya que determina la distribución de estas partículas y que puedan o no ser absorbidas a circulación sistémica.

Para determinar cómo actúan en el medio líquido donde las partículas podrían estar presentes fisiológicamente, se mide el tamaño de partículas y de los agregados. La distribución de las partículas de E171 en los medios gastrointestinales y el tejido adyacente, depende de su estado de agregación (Vishwakarma et al., 2010). Los tamaños hidrodinámicos de los agregados cambian dependiendo del pH del medio. Otro factor que determina el tamaño de los agregados, es la interacción con proteínas como la albúmina o muchas otras proteínas como las que contiene el SFB generan agregados de diferentes tamaños. Para el E171 es mayor la distribución cuando es menor el tamaño del agregado, por ejemplo en medio rico en nutrientes y biomoléculas como las del cultivo con SFB (Freyre-Fonseca et al., 2016).

La corona que se forma alrededor de las partículas de E171 al estar presentes biomoléculas, generan una mayor dispersión de partículas, respecto a solo la presencia de iones en solución. Similar a como podría encontrarse en otros alimentos, las partículas de E171 en este estudio tienen una corona compuesta por las biomoléculas del alimento para roedores ENVIGO. La corona de fibra de cereales, proteínas y lípidos, proveniente del alimento debe de considerarse en este estudio, al momento de tener en cuenta sus efectos. La presencia de la corona permite la unión de otras biomoléculas presentes en las diferentes mucosas gastrointestinales y sus ambientes fisicoquímicos particulares, formando así la biocorona (Neagu et al., 2017). La simulación del alimento con E171 nos permite determinar el comportamiento de las moléculas dentro de ambientes fisiológicos cercano a como se encuentra en un individuo. Se sabe cómo pueden aglomerarse y variar de tamaño las partículas de E171, tras la formación de la biocorona por fluidos salivales, gástricos e intestinales (Stippler et al., 2014). Encontrándose entre tamaños hidrodinámicos de 150 hasta 2000 nm, siendo el tamaño principal de 200 nm hasta después de 1 hora en saliva. En fluidos gástricos puede tener un tamaño hidrodinámico desde 120 hasta 3000 nm, con una mayor cantidad de partículas de tamaño entre 150 y 200 nm hasta después de 8 horas, este último rango de tamaños similares a los reportados en este trabajo. Mientras en fluidos intestinales se pueden encontrar tamaños desde 150 hasta 2000 nm, con tamaños principales de partículas entre 200 y 300 nm después de 8 horas, diferente al rango de tamaño encontrados en este trabajo de 300 a 600 nm (Sohal et al., 2018). Los tamaños determinados de los agregados de alimento con E171, entran dentro del rango de



tamaños de partículas de cómo se puede encontrar el  $\text{TiO}_2$  grado alimenticio. Esta dispersión de tamaños se determina a partir de la medición del tamaño hidrodinámico y del potencial Z, condiciones determinantes implicadas en la capacidad de las partículas de precipitarse o dispersarse en el organismo. El potencial Zeta determinó que las partículas de E171 en todos los fluidos son inestables y tenderán a precipitar en el medio donde se encuentran. Mientras que el índice de polidispersión determina que hay una gran variedad de tamaños entre las partículas de E171 y no son partículas de un solo tamaño. La manera en la que actúan las partículas de E171 con las células se ve aumentada cuando estas son más pequeñas y dispersas (Zhang et al., 2014; OECD 2015; Avramescu et al., 2017, Sohal et al., 2018).

El alimento preparado disminuyó su dureza, factor a considerar al momento de relacionar la cantidad de comida ingerida. Acorde a la concentración de E171 añadido en el alimento, con cantidades a proporciones de 0.1 y 0.5% de E171 añadido, los pellets presentaron una disminución significativa en la dureza, siendo mayor la diferencia en el alimento preparado a 1% de E171. Es decir la cantidad a la que lo limita la regulación de la FDA. Solo el grupo de 0.1% registró un menor consumo de alimento en este grupo, aunque el peso de los ratones de este grupo no cambió de manera significativa. Por lo cual no se puede relacionar la cantidad de E171 respecto a la cantidad de alimento consumido. Solo el grupo de dieta a 0.5% de E171, presentó un aumento significativo en el peso adquirido al final del estudio.

La mayoría de los estudios que evalúan el efecto de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  en testículos de manera IG, ocupan medios acuosos para dispersar las partículas al administrarse vía oral (Wang et al., 2007; Gao et al., 2013; Jia et al., 2014; Meena et al., 2015; Smith et al., 2015; Orazizadeh et al., 2016; Shanin et al., 2017; Miura et al., 2017; Khorsandi et al., 2017; Morgan et al., 2017; Shanin et al., 2017; Song et al., 2017; El-Missiry et al., 2017; Sharafutdinova et al., 2018; Elnagar et al., 2018), haciendo a este trabajo diferente al administrar al E171 en la matriz sólida de los pellets y caracterizando tanto el E171, como el alimento con E171. El medio acuoso no representa la forma en la que se encuentra normalmente el E171 en la mayoría de los productos alimenticios sólidos pero representa la fracción como se encuentra en los fluidos fisiológicos (Sohal et al., 2018).

Las cantidades de E171 que los ratones consumen se estimaron con base en la cantidad semanal de alimento consumido por ratón alimento. Semanalmente el consumo con dieta y teniendo en cuenta sus pesos semanales se estimaron dosis para la dieta de 0.1% que van de 16.28 a 21.48 g de alimento y una dosis de entre 85-115 mg/kg peso/día, con dieta de 0.5% de 21.76 a 25.98 g de alimento con una dosis de entre 630-830 mg/kg peso/día y con dieta de 1% de 21.20 a 25.8 g de alimento con una dosis de entre 1110-1670 mg/kg peso/día. El régimen de dieta más cercano al consumo estimado de E171 diario en humanos es el de 0.1% que supera de ocho a once veces la dosis estimada de consumo para el humano que es de hasta 10.4 mg/kg y el de 1% supera 100 veces estas cantidades estimadas. Se debe considerar también que el metabolismo del ratón es mucho más rápido, razón por la que al comparar los datos se debe tener en consideración una mayor dosis en el ratón para igualarla la permanencia de las partículas en el organismo del humano. Órganos con endotelio fenestrado discontinuo, permiten el paso de partículas de un tamaño entre 75 y 200 nm. Órganos con una

amplia distribución de tejido linfático como hígado, bazo y medula ósea, son órganos con este tipo de endotelio y también a los que en mayor cantidad llegan las partículas de  $TiO_2$ .

El peso de testículos y epidídimos en ningún grupo tuvo cambios significativos tras siete semanas de alimentación con E171 entre los diferentes grupos y el control, acorde al tiempo de alimentación de 7 semanas. Mostrando así que no se presentan alteraciones significativas en estos órganos a estas cantidades y tiempo, como para generar una disminución o aumento de peso en testículos o epidídimos.

Si el alimento favorece la dispersión de las partículas de E171, estas pueden llegar y acumularse en testículos que poseen circulación sanguínea y linfática. Se sabe que una vez disponible la internalización puede llevarse a cabo por procesos de fagocitosis en diferentes tipos de células e intracelularmente llevar a cabo su efecto patológico. Debido al efecto de las partículas óxido metálicas en organismos biológicos de generar especies reactivas de oxígeno (Dayem et al., 2017). Se debe de enfatizar que es complicado confirmar que los efectos observados en el presente trabajo sean a causa del E171 acumulado en testículos, ya que no se determinó la presencia de Ti en el tejido. Sin embargo, fracciones nanométricas de  $TiO_2$  en testículos y en tejido escrotal adyacente se han detectado por espectrometría (Smith et al., 2015). En caso de que las partículas de E171 lleguen de manera paracelular dentro de los túbulos seminíferos, estas podrían interactuar con los componentes intercelulares que conforman la BHT entre células de Sertoli y Sertoli. Las partículas a escala nanométrica son de por sí, capaces de separar las interacciones que se dan entre la unión de dos proteínas de N-cadherina (Setyawati et al., 2013). Razón por la cual se sospechó desde un principio en la posible afectación de la BHT. Para evaluar el posible efecto del E171 en componentes testiculares, se procesaron de manera cuidadosa los testículos de ratón para ser evaluados histológicamente según su posicionamiento anatómico. La viabilidad del análisis depende de obtener cortes ideales para analizar la mayor cantidad de túbulos seminíferos transversalmente para su análisis (Lanning et al., 2002); National Toxicology Project). En los cortes transversales de testículo se cuantificaron todos los túbulos seminíferos evaluados de la muestra representativa. Las micrografías evalúan un mínimo de 60% del área total de toda la sección completa del testículo y únicamente se consideraron en el conteo los túbulos completos. Se identificaron en todos los ratones alimentados con E171, túbulos con desprendimiento del epitelio germinal y se cuantificaron porcentualmente respecto a los túbulos cuantificados. Este desprendimiento epitelial se caracteriza por la separación de las células de sertoli que sostienen a espermatídes y espermatoцитos del resto de estructuras unidas a la membrana basal, manteniéndose unidas las espermatogonias (Thakur et al., 2014). Este efecto es similar al que presenta el modelo de daño a BHT inducido por la alimentación con cadmio, siendo probable que esta estructura esté implicada en la fragilidad tisular (Squadrito et al., 2016). Sin embargo, la forma en la que las partículas, en especial a tamaño nanométrico puedan estar generando este proceso de daño a BHT aún no está claro. Algunos efectos reportados por estas pueden ser físicos, interactuando y separando la unión de proteínas membranales (Setyawati et al., 2013) o químicos, con la formación de ROS por su capacidad de alteración química a biomoléculas, especialmente al material genético. Bien el E171 puede estar afectando de manera indirecta a otros tipos de células o sistemas que puedan generar

compromiso para la BHT (Fu et al.2014). El desprendimiento germinal y aún más la descamación pueden estar relacionadas a una disminución en la cantidad de espermatozoides liberados y formados de manera correcta, al no permitir que se desarrolle la espermatogénesis de forma completa (Creasy et al., 2003). El desprendimiento epitelial se ve aumentado en los testículos de todos los ratones alimentados con E171. La descamación germinal es una de las evidencias histológicas que implica el desarrollo incompleto de las células germinales y tuvo un aumento significativo en los ratones alimentados con 1% de E171. Consecuentemente menores números de espermatozoides y una mayor cantidad de anomalías morfológicas pueden ser encontrados como causa de este efecto. De manera similar en los grupos con dieta de 0.5 y 1% mediante tinción de tricrómica de Masson fue posible observar un aparente engrosamiento de parénquima. El engrosamiento de los componentes de colágeno presentes en el parénquima testicular se asocia a una pérdida de la capacidad epitelial de sostener, nutrir y permitir el desarrollo de los espermatozoides (Zhu et al., 2015). El infiltrado en el parénquima acompañado por un aumento en la cantidad de células (Smith et al., 2015) macrófagas y de regulación inmune pueden generar desregulación de la capacidad esteroidogénica (Zhu et al., 2015).

El conteo de las células presentes en el parénquima se delimitó a zonas características, donde se encontraban íntegros tres túbulos seminíferos recubriendo y no cuatro o más, para homogenizar el análisis de los datos. El promedio de células por campo contados fue mayor únicamente en el parénquima testicular de los ratones alimentados con 1% de E171. Con estos resultados se tenía la sospecha de un posible proceso de inflamación causado por la dieta con E171, por lo que se evaluó la expresión de MHC II con la finalidad de identificar de manera selectiva la presencia de células inmunes presentes en el parénquima (Neefjes et al., 2011). El marcaje positivo de inmunofluorescencia para este complejo fue ubicado únicamente en algunas células dentro del parénquima testicular en los controles, correspondiente a la presencia de macrófagos testiculares, linfocitos o células dendríticas de manera normal. Aunque la cuantificación de fluorescencia en los testículos de los ratones con dieta de 0.1% fue ligeramente menor a los controles, se observa un ligero marcaje no solo en el parénquima si no en células dentro de los túbulos. Fuera de las células inmunes que de forma basal expresan MHC II, otros tipos de células expresan este únicamente bajo estímulos inflamatorios. Las cantidades de fluorescencia en los testículos de ratones con dietas de 0.5 y 1% fue significativamente mayor, además de presentar marcaje por parte de células del epitelio seminífero, confirmando la presencia de un proceso inflamatorio. El aumento en la expresión de MHC II como efecto de la exposición a E171 se ha demostrado con base en la cuantificación de una mayor cantidad de células dendríticas en las placas de Peyer (Bettini et al., 2017). Los procesos inflamatorios en testículos donde interviene la acción de TNF se presenta junto con infiltrado celular y disminución de la fertilidad (Hong et al., 2016). Inflamación en los tejidos permite la mayor permeabilidad y pasaje de componentes provenientes de circulación sanguínea. Órganos con barreras físicas siempre cerradas son de interés para la evaluación de la llegada y efecto de las partículas de dióxido de titanio. La exposición de las partículas en medio de cultivo con tamaños de partículas nanométricos, son capaces de ser endocitadas por

células de órganos con barreras físicas como la hematoencefálica (Disdier et al., 2017) y hematoplacentaria (Kreyling et al, 2017) generando alteraciones particulares en cada órgano. El daño a la BHT se evidencia con la disminución significativa de los complejos cadherina/catenina por procesos de endocitosis de N-cadherina lo que genera la disminución de su presencia en testículos y con esto se presenta la fragilidad del tejido con BHT. En las determinaciones inmunohistoquímicas de N-cadherina se puede observar su presencia principalmente en el parénquima testicular y muy poco en la zona de la membrana basal de los túbulos seminíferos. El marcaje para N-cadherina resulta significativamente menor en los testículos de ratones alimentados con dieta de E171 al 0.5 y 1%. Sospechándose de esta manera de una posible regulación negativa de N-cadherina (Setyawati et al., 2013), que podría estar implicada en una BHT subóptima. La pérdida de uniones celulares entre las células del epitelio germinal, puede generar la separación de las células antes de tiempo. La separación de uniones celulares en epitelio seminífero tiene como consecuencia un desarrollo incompleto y con esto una ausencia de funcionalidad de los espermatozoides al interrumpirse el proceso de espermatogénesis. Además de la testosterona producida por las células de Leydig, y los factores de las células inmunes, los componentes de la matriz extracelular también están implicados en la regulación de la espermatogénesis (Creasy, 2003). Uno de los componentes de la matriz extracelular implicado en la regulación de la espermatogénesis es el colágeno. El colágeno mantiene unidos componentes celulares y señala, principalmente para las células más cercanas a donde se encuentra esta como las espermatogonias (Shayakhmetova et al., 2013). Los resultados aquí presentes evidencian la disminución en la detección de colágeno principalmente de las células germinales y células del parénquima, en los ratones con dosis de 0.5 y 1%. Las espermatogonias pueden permanecer arrestadas en fase S del ciclo celular cuando existe una disminución en la expresión de colágeno, además de no poder llegar a la fase meiótica (He et al., 2005). La determinación de hidroxiprolina muestra una disminución en los grupos con dieta al 0.5 y 1%. El paso de prolina a hidroxiprolina es un proceso postraducciona que puede verse afectado al existir estrés oxidativo. Al verse disminuida la hidroxiprolina la composición de los epitopes reconocidos por el anticuerpo pueden cambiar. Este mismo cambio en la proporción de los aminoácidos puede generar que la acción normal del colágeno se altere y su acción reguladora se vea afectada (Shayakhmetova et al., 2013). En conjunto los marcadores evaluados y la evidencia histológica hace pensar que el desarrollo espermático puede ser subóptimo, principalmente en los grupos que presentan desprendimiento epitelial, descamación germinal, inflamación, evidenciado por un aumento de las células parenquimales y la expresión de MHC II, así como disminución de N-cadherina y colágeno, implicadas directamente en la regulación de la espermatogénesis (Yan Cheng et al., 2012). El epidídimo que permite la funcionalidad de los espermatozoides resulta de interés evaluatorio, debido a la presencia de células germinales inmaduras y de que el epidídimo recibe losm componentes de excreción de los tubulos seminíferos, entre ellos las partículas de E171 si es que son excretadas de esta forma. Para la maduración de los espermatozoides el epidídimo es el órgano encargado y es uno de los órganos que recientemente ha recibido atención por su alta cantidad de tejido linfático y sus características inmunoprivilegiadas, similares a las presentes en testículo (Gregory et al., 2014). Uno de los efectos de la dieta de

E171 observado en este estudio es la presencia de vacuolizaciones en la región caput del epidídimo. Este tipo de estructuras intracelulares están relacionadas a procesos de fosfolipidosis. Cabe resaltar que estos efectos se ven generalizados a lo largo de todo el epitelio presente tanto de área caput como cauda. La fosfolipidosis es un aumento en la cantidad de fosfolípidos o cuerpos lamelares (Rudmann et al., 2004). Un aumento de fosfolípidos aumenta por la cantidad de lípidos que requiere la célula y esto se ve favorecido ante procesos de endocitosis de partículas extrañas. La presencia de estos cuerpos aunque no es letal para la célula es un indicativo de que procesos celulares que pueden verse alterados. En el caso de epidídimo a la altura caput, alteraciones en epididimosomas podría favorecer que no se lleven a cabo la maduración adecuada de los espermatozoides (Creasy et al., 2012). A la altura de la cauda también se presenta un efecto como consecuencia de las partículas de E171, la disminución de prolongaciones celulares que interactúen con espermatozoides. Efectos similares en prolongaciones celulares de epitelio colonico han sido observados como efecto de la presencia de partículas de dióxido de titanio (Brun et al., 2014). Como forma de explicar el daño celular hace falta indicar si la presencia de estas vacuolas dentro de la célula puede aumentar al aumentar el estrés oxidativo. La pérdida de contacto del epitelio de la región cauda con espermatozoides es un indicativo de alteración de las estructuras celulares epiteliales. Estas observaciones en órganos del desarrollo espermático pueden ser factores que estén implicados en la disminución capacidad fertilizante de los espermatozoides (Lanning et al., 2002). Para favorecer la información obtenida es posible la proyección de estudios que evalúen la reprotoxicidad del E171 en varias generaciones, con los individuos necesarios y por el tiempo más cercano al de una exposición crónica. Cabe preguntar si la cantidad de E171 ingerida por un individuo es necesaria para tener el efecto observado, por ejemplo en personas con dieta alta o que únicamente consume productos con E171. Sin embargo la falta de estudios que evalúen la cantidad y el tipo de partículas que conforma el E171 en alimentos de consumo mexicano no están disponibles. Por la ausencia de estos datos no se puede tener una estimación aproximada de la cantidad de E171 ingerida por la población mexicana.

## **8. CONCLUSIONES**

En conclusión, la alimentación con E171 en una matriz sólida tuvo como efecto alteraciones histológicas a nivel testicular como desprendimiento del epitelio germinal de manera significativa en todos los ratones alimentados con E171 y descamación de células germinales en ratones con dieta de E171 a 1%. Se encontró un aumento significativo de células del parénquima a la más alta cantidad de E171, un aumento en la expresión de MHC II, evidenciando proceso de inflamación en ratones con dieta de 0.5% y 1% de E171, en estos mismos grupos se encontró disminución en la concentración de hidroxiprolina. La integridad de la barrera hematotesticular se vio comprometida por la disminución de N-cadherina y colágeno I, en todos los grupos con dieta de E171. En epitelio epididimal de la región caput, tras la alimentación con dieta de 0.5% y 1% de E171, se encuentran un aumento de vacuolas y desorganización o destrucción del epitelio. En epitelio epididimal de la región cauda, se observa una disminución en la interacción entre espermatozoides de esa zona y el epitelio, tras la alimentación con dieta de 0.5% y 1% de E171. Estas alteraciones en testículo y epidídimo podrían llegar a afectar la calidad en la integridad de los espermatozoides.

## 9. REFERENCIAS

- Ans, F. (2016). Re-evaluation of titanium dioxide (E 171) as a food additive. *EFSA Journal*, 14(9), e04545.
- Avramescu, M. L., Rasmussen, P. E., Chénier, M., & Gardner, H. D. (2017). Influence of pH, particle size and crystal form on dissolution behaviour of engineered nanomaterials. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2), 1553–1564.
- Bettini, S., Boutet-Robinet, E., Cartier, C., Coméra, C., Gaultier, E., Dupuy, J. Houdeau, E. (2017). Food-grade TiO<sub>2</sub> impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Scientific Reports*, 7, 40373.
- Brehm R., (2005). Regulation of Sertoli cell and germ cell differentiation. Springer, USA.
- Brohi, R. D., Wang, L., Talpur, H. S., Wu, D., Khan, F. A., Bhattarai, D., Huo, L. J. (2017). Toxicity of nanoparticles on the reproductive system in animal models: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 1–22.
- Brun, E., Barreau, F., Veronesi, G., Fayard, B., Sorieul, S., Chanéac, C., Carrière, M. (2014). Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1), 1–16.
- C. Yan Cheng, Dolores D. Mruk. (2012). The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception, *Pharmacological Reviews*; 64(1): 16–64.
- Cao, X., Shen, L., Wu, S., Yan, C., Zhou, Y., Xiong, G., Wei, G. (2017). Urban fine particulate matter exposure causes male reproductive injury through destroying blood-testis barrier (BTB) integrity, *Toxicology Letters*, 266, 1–12.
- Cheng Y., (2008) The Blood-Testis Barrier and Its Implications for male Contraception. *Pharmacological Reviews*; 64:16–64, 2012
- Cooper, T. G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 13(1), 130–138.
- Chen, Z., Wang, Y., Ba, T., Li, Y., Pu, J., Chen, T., Jia, G. (2014). Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicology Letters*, 226(3), 314–319.
- Creasy, D. M. (2003). Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, 68(5), 408–415.
- Creasy, D., Bube, A., Rijk, E. de, Kandori, H., Kuwahara, M., Masson, R., Whitney, K. (2012). Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Male Reproductive System. *Toxicologic Pathology*, 40(6\_suppl), 40S–121S.
- Dayem, A. A., Hossain, M. K., Lee, S. Bin, Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., Cho, S. G. (2017). The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 1–21.
- DeFalco, T., Potter, S.J., Williams, A.V., Waller, B., Kan, M.J., & Capel, B. (2015). Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis. *Cell Reports*, 12(7), 1107–1119.
- De Grava Kempinas, W., & Klinefelter, G. R. (2014). Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*, 4(2), e979114.
- Directorate, E., Meeting, J. The, O. F., Committee, C., Working, T. H. E., & On, P. (2009). The working party on chemicals, pesticides and biotechnology ENV/JM/MONO(2010) 46 Unclassified. *Development*, 33(207), 1–16.
- DeLoid, G. M., Wang, Y., Kapronezai, K., Lorente, L. R., Zhang, R., Pyrgiotakis, G., Demokritou, P. (2017). An integrated methodology for assessing the impact of food matrix and gastrointestinal effects on the biokinetics and cellular toxicity of ingested engineered nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology*, 14(1), 1–17.
- Directorate, E., Meeting, J., The, O. F., Committee, C., Working, T. H. E., & On, P. (2009). Information Gathering Schemes on Nanomaterials: Lessons Learned and Reported Information. *Development*, 33(31), 1–16.
- Disdier, C., Chalansonnet, M., Gagnaire, F., Gaté, L., Cosnier, F., Devoy, J., Saba, W., Lund, A. K., Brun, E., & Mabondzo, A. (2017). Brain Inflammation, Blood Brain Barrier dysfunction and Neuronal Synaptophysin Decrease after Inhalation Exposure to Titanium Dioxide Nano-aerosol in Aging Rats. *Scientific Reports*, 7(1), 12196.

El-missiry, M. A., Fayed, H., Othman, A. I., Mona, S., Shabana, S., & Khalifa, E. (2017). Titanium Dioxide Nanoparticles Provoke Testicular Injury and Apoptosis in Sperm through Oxidative Stress-Activated Mitochondrial and Death Receptor Pathways, *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*, Vol 3 (11), 517–525.

European Commission. (2017). Call for scientific and technical data on the permitted food additive titanium dioxide (E 171), 1(January), *Official Journal of the European Union*, L354, Vol 51, 1–5.

Faust, J. J., Doudrick, K., Yang, Y., Capco, D. G., & Westerhoff, P. (2016). A facile method for separating and enriching nano and submicron particles from titanium dioxide found in food and pharmaceutical products. *PLoS ONE*, 11(10), 1–15.

Florman, H. M., & Fissore, R. A. (2014). Fertilization in Mammals. In T. M. Plant, & A.J. Zeleznik (Eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (4<sup>th</sup> ed., Vol. I, pp.149-196). USA: Elsevier

França, L. R., Hess, R. A., Dufour, J. M., Hofmann, M. C., & Griswold, M. D. (2016). The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, 4(2), 189–212.

Freyre-Fonseca, V., Téllez-Medina, D. I., Medina-Reyes, E. I., Cornejo-Mazón, M., López-Villegas, E. O., Alamilla-Beltrán, L., Gutiérrez-López, G. F. (2016). Morphological and Physicochemical Characterization of Agglomerates of Titanium Dioxide Nanoparticles in Cell Culture Media, *Hindawui Publishing Corporation*, 2016.

Fu, P. P., Xia, Q., Hwang, H. M., Ray, P. C., & Yu, H. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), 64–75.

Gatoo, M. A., Naseem, S., Arfat, M. Y., Dar, A. M., Qasim, K., & Zubair, S. (2014). Physicochemical Properties of Nanomaterials : Implication in Associated Toxic Manifestations, *Hindawui Publishing Corporation*, 2014.

Gregory, M., & Cyr, D. G. (2014). The blood-epididymis barrier and inflammation, *Spermatogenesis* 4:2 (August), 1–13.

Guiton, R., Henry-berger, J., & Drevet, J. R. (2013). Epididymis Immunology Mammals, *Basic and Clinical Andrology*, 23:8

Hales DB. (2002) Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *Journal Reproductive Immunology*, 57(1-2):3-18.

Hauser R., Sokol R., (2008) Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. *Fertility and Sterility*. 89(1) 73:243–278

He Z, Feng L, Zhang X, Geng Y, Parodi DA, Suarez-Quian C, Dym M. (2005) Expression of Col1a1, Col1a2 and procollagen I in germ cells of immature and adult mouse testis. *Reproduction*. 130(3):333-41.

Hedger, M. P. (2015). The Immunophysiology of Male Reproduction. In T. M. Plant, & A.J. Zeleznik (Eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (4<sup>th</sup> ed., Vol. I, pp.805-892). USA: Elsevier

Heringa

Hermo L., Pelletier R. M., Cyr D.G., Smith C. E. (2010) Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins expressed by Testicular Germ Cells. Part 1: Background to spermatogenesis, spermatogonia, and Spermatoocytes. *Microscopy Research and Technique* 73:279-319 (2010)

Hong, F., Wang, Y., Zhou, Y., Zhang, Q., Ge, Y., Chen, M., Wang, L. (2016). Exposure to TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Induces Immunological Dysfunction in Mouse Testitis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(1), 346–355.

IARC. (1989). Titanium Dioxide. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 47(October 1988), 303–328.

Janer, G., Mas del Molino, E., Fernández-Rosas, E., Fernández, A., & Vázquez-Campos, S. (2014). Cell uptake and oral absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters*, 228 (2), 103–110.

Jani, P. U., McCarthy, D. E., & Florence, A. T. (1994). Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 105(2), 157–168.

Jia, F., Sun, Z., Yan, X., Zhou, B., & Wang, J. (2014). Effect of pubertal nano-TiO<sub>2</sub> exposure on testosterone synthesis and spermatogenesis in mice. *Archives of Toxicology*, 88(3), 781–788.



- Jones, K., Morton, J., Smith, I., Jurkschat, K., Harding, A. H., & Evans, G. (2015). Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters*, 233(2), 95–101.
- Kuznesof, P. M. (2006). Titanium Dioxide: Chemical and Technocal Assessment. 1(171), 1–8.
- Lanning, L. L., Creasy, D. M., Chapin, R. E., Mann, P. C., Barlow, N. J., Regan, K. S., & Goodman, D. G. (2002). Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30(4), 507–520.
- Lehto S, Buchweitz M, Klimm A, Straßburger R, Bechtold C, Ulberth F. (2017) Comparison of food colour regulations in the EU and the US: a review of current provisions. *Food Additive Contaminants. Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment.*; 34(3):335-355.
- Liu, X., Jin, X., Su, R., & Li, Z. (2017). The reproductive toxicology of male SD rats after PM2.5 exposure mediated by the stimulation of endoplasmic reticulum stress. *Chemosphere*, 189, 547–555.
- Martin-DeLeon, P., Aravindan, R., Smith, M., Michael, R., Dash, S., Shah, S., & Galileo, D. (2014). Anatase titanium dioxide nanoparticles in mice: evidence for induced structural and functional sperm defects after short-, but not long-, term exposure. *Asian Journal of Andrology*, 17(2), 261.
- Meinhardt, A., & Hedger, M. P. (2011). Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335(1), 60–68.
- Miura, N., Ohtani, K., Hasegawa, T., Yoshioka, H., & Hwang, G.-W. (2017). High sensitivity of testicular function to titanium nanoparticles. *The Journal of Toxicological Sciences*, 42(3), 359–366.
- Mochelle K.Y. (2008) Extracellular matrix and its role in spermatogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 636: 74–91
- Montoya, J. J., & Arta, A. V. (2009). Vaginal tunic metastasis as a first sign of colorectal cancer, *Cirugia española* 86(3), 184–186.
- Nabela, I., Sharkawy E. I., Hamza, M. Y., & Abou-Zeid, A. (2010). Toxic Impact of Titanium Dioxide (TiO<sub>2</sub>) In Male Albino Rats with Special Reference to its Effect on Reproductive System. *Journal of American Science*, 6(11), 865–872.
- Neefjes, J., Jongsmá, M. L. M., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 11(12), 823–836.
- Neagu, M., Piperigkou, Z., Karamanou, K., Engin, A. B., Docea, A. O., Constantin, C., Tsatsakis, A. (2017). Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology. *Archives of Toxicology*, 91(3), 1031–1048.
- Neefjes, J., Jongsmá, M. L. M., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 11(12), 823–836.
- OECD. (2009). No 13: Report of an OECD workshop on exposure assessment and exposure mitigation: manufactured nanomaterials env/jm/mono 18.
- OECD. (2015). Test No. 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. *OECD*, 14.
- Orazizadeh M, Daneshi E, Hashemitmar M, Absalan F, Khorsandi L. Protective effect of beta-carotene against titanium dioxide nanoparticles induced apoptosis in mouse testicular tissue. *Andrologia*. 2015;47 (7):816-25.
- Pandey, R. K., & Prajapati, V. K. (2018). Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(PartA), 1278–1293.
- Patricia A Martin-DeLeon. (2015). Epididymosomes: transfer of fertility-modulating proteins to the sperm surface *Asian Journal of Andrology*. 17, 720–725
- Pearl P.Y. Lie, (2013) Signalling pathways regulating the blood–testis barrier *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (2013) 621– 625
- Pele, L. C., Thoree, V., Bruggaber, S. F. A., Koller, D., Thompson, R. P. H., Lomer, M. C., & Powell, J. J. (2015). Pharmaceutical/food grade titanium dioxide particles are absorbed into the bloodstream of human volunteers. *Particle and Fibre Toxicology*, 12(1), 1–6.

- Proquin, H., Rodríguez-Ibarra, C., Moonen, C. G. J., Urrutia Ortega, I. M., Briedé, J. J., de Kok, T. M., Chirino, Y. I. (2017). Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis*, 32(1), 139–149.
- Robaire, B., & Hinton, B. T. (2015). *Chapter 17– The Epididymis. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)*. Elsevier.
- Rudmann, D. G., Mcnerney, M. E., Vandereide, S. L., Schemmer, J. K., Eversole, R. R., & Vonderfecht, S. L. (2004). Epididymal and Systemic Phospholipidosis in Rats and Dogs Treated with the Dopamine D3 Selective Antagonist PNU-177864. *Toxicologic Pathology*, 32(3), 326–332.
- Shahin, N. N., Mohamed, M. M. (2017). Nano-sized titanium dioxide toxicity in rat prostate and testis: Possible ameliorative effect of morin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 334(July), 129–141.
- Sharafutdinova LA, Fedorova AM, Bashkatov SA, Sinel'nikov KN, Valiullin VV. (2018) Structural and Functional Analysis of the Spermatogenic Epithelium in Rats Exposed to Titanium Dioxide Nanoparticles. *Bull Exp Biol Med*. 2018;166(2):279-282.
- Shayakhmetova, G. M., Bondarenko, L. B., Kovalenko, V. M., & Ruschak, V. V. (2013). CYP2E1 testis expression and alcohol-mediated changes of rat spermatogenesis indices and type I collagen. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 64(2), 237–246.
- Shechter, R., London, A., & Schwartz, M. (2013). Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: Absolute barriers versus educational gates. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), 206–218.
- Smith MA, Michael R, Aravindan RG, Dash S, Shah SI, Galileo DS, M. Anatase titanium dioxide nanoparticles in mice: evidence for induced structural and functional sperm defects after short-, but not long-, term exposure. *Asian of Journal Andrology*, 2015 Mar-Apr;17(2):261-8.
- Sohal, I. S., Cho, Y. K., O'Fallon, K. S., Gaines, P., Demokritou, P., & Bello, D. (2018). Dissolution Behavior and Biodurability of Ingested Engineered Nanomaterials in the Gastrointestinal Environment. *ACS Nano*, acsnano.8b02978.
- Sohal, I. S., Fallon, K. S. O., Gaines, P., Demokritou, P., & Bello, D. (2018). Ingested engineered nanomaterials : state of science in nanotoxicity testing and future research needs. *Particle and Fibre Toxicology*, 15:29.
- Song, G., Lin, L., Liu, L., Wang, K., Ding, Y., Niu, Q., Guo, S. (2017). Toxic Effects of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles on Spermatogenesis and Testicles in Male Mice, 26(6), 2739–2745.
- Squadrito, F., Micali, A., Rinaldi, M., Irrera, N., Marini, H., Puzzolo, D., Minutoli, L. (2017). Polydeoxyribonucleotide, an adenosine-A2A receptor agonist, preserves blood-testis barrier from cadmium-induced injury. *Frontiers in Pharmacology*, 7(JAN), 1–11.
- Stippler E, Sabine K, Jennifer BD. Comparison of US Pharmacopeia Simulated Intestinal Fluid TS (without pancreatin) and Phosphate Standard Buffer pH 6.8, TS of the International Pharmacopoeia with Respect to Their Use in In Vitro Dissolution Testing. *Dissolution Technologies*. 2004.
- Sycheva, L. P., Zhurkov, V. S., Iurchenko, V. V., Daugel-Dauge, N. O., Kovalenko, M. A., Krivtsova, E. K., & Durnev, A. D. (2011). Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726(1), 8–14.
- Tang, E. I., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2016). Seminars in Cell & Developmental Biology Regulation of microtubule ( MT ) - based cytoskeleton in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 59, 35–45.
- Urrutia-Ortega, I. M., Garduño-Balderas, L. G., Delgado-Buenrostro, N. L., Freyre-Fonseca, V., Flores-Flores, J. O., González-Robles, A., Chirino, Y. I. (2016). Food-grade titanium dioxide exposure exacerbates tumor formation in colitis associated cancer model. *Food and Chemical Toxicology*, 93, 20–31.
- Vishwakarma, V., Samal, S. S., & Manoharan, N. (2010). Safety and Risk Associated with Nanoparticles - A Review, 9(5), 455–459./
- Wu, T., & Tang, M. (2018). Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs. *Journal of Applied Toxicology*, 38(1), 25–40.
- Winkler, H. C., Suter, M., & Naegeli, H. (2016). Critical review of the safety assessment of nano-structured silica additives in food. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 1–19.

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

Wang R, Song B, Wu J, Zhang Y, Chen A, Shao L. Potential adverse effects of nanoparticles on the reproductive system. *Int J Nanomedicine*. 2018 Dec 11;13:8487-8506.

Wong, C. H., & Cheng, C. Y. (2005). The Blood-Testis Barrier: Its Biology, Regulation, and Physiological Role in Spermatogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 71(5), 263–296.

Yang, Y., Doudrick, K., Bi, X., Hristovski, K., Herckes, P., Westerhoff, P., & Kaegi, R. (2014). Characterization of food-grade titanium dioxide: The presence of nanosized particles. *Environmental Science and Technology*, 48(11), 6391–6400.

Zhang, Y., Bai, Y., Jia, J., Gao, N., Li, Y., Zhang, R., Yan, B. (2014). Perturbation of physiological systems by nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 43(10), 3762–3809.