



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOMEDICINA

LABORATORIO DE CARCINOGENESIS Y TOXICOLOGÍA

**EFFECTOS HEMATOLÓGICOS DE LA ADMINISTRACIÓN
INTRAVENOSA DE NANOPARTÍCULAS ÓXIDO
METÁLICAS/METALOIDES EN UN MODELO *IN VIVO***

Tesis profesional para obtener el título de:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ALEJANDRO AMHED ZAGAL SALINAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de carcinogénesis y toxicología de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por la Dra. Yolanda Irasema Chirino López.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro

Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras

Dra. Ana María García Bores

Dra. Sonia Andrea León Cabrera

Para la realización de esta tesis se contó con el apoyo de:

UNAM PAPIIT IN218015

CONACyT 268769

DEDICATORIAS

"El éxito está determinado por la reacción a los obstáculos que te plantea la vida. Si los ves como un muro se convierte en una excusa para el fracaso, pero si los ves como una valla cada una te va fortaleciendo para la siguiente".

A mi padre:

Estoy orgulloso de ser como soy y eso te lo debo a ti. Muchas gracias porque tus consejos me ayudan a tomar las decisiones correctas, porque tu esfuerzo ha hecho que no me falte nada y sobre todo por tu amor y cariño incondicional.

A mi madre:

Tú que me has dado todo sin pedir nada a cambio, que has dejado todo por mí. Te agradezco porque soy el hombre que soy gracias a ti y que siempre estarás conmigo en las buenas y en las malas. Por abrirme los brazos cuando no tenía donde ir, por levantarme el ánimo cuando fracasaba, por confiar en mí cuando yo no confiaba ni en mí mismo, por tu fe sin límites y por esto y millones de cosas más gracias.

A mi hermana:

Te agradezco el ser mi compañera de aventuras desde que los 6 años, a la que siempre le podía contar mis problemas y secretos y que siempre está cuando te necesito. Muchas gracias chaparrita.

A mi novia ANZA:

En mi largo recorrido por la vida nunca antes encontré a una persona tan única como tú. Aunque no sea muy expresivo quiero decirte que eres la luz de días, la que me impulsa a ser una mejor persona y eres aquella con la que no puedo parar de demostrar todo el amor que tengo. Eres lo más bello que me ha pasado bombón.

A todos ustedes muchísimas gracias por todo, por siempre estar para mí así como yo lo estaré para ustedes. Los amo con todo mi hipotálamo.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la FESI por haberme otorgado la oportunidad de desarrollarme académica y profesionalmente en sus aulas. Por haberme otorgado el espacio y los medios para la realización de esta tesis.

A la Dra. Yolanda Irasema Chirino López por apoyarme tanto fuera como dentro del laboratorio y por ayudarme a aprovechar todo mi potencial con Ud. Por ser más que una mentora para mí, muchísimas gracias por todo.

A la Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro por su amistad, por todos sus consejos que han y seguirán siendo útiles para mí y por sus aportaciones a este proyecto.

Agradezco al Dr. José Ocotlán Flores-Flores del Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) en el Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM por su valiosa ayuda en la caracterización de las nanopartículas y síntesis de nanofibras de dióxido de titanio así como a la M.V.Z. Ma. Leticia Flores Sánchez, al Biol. Tomás Ernesto Villamar Duque y al M. en C. Fernando Barron Moreno del Bioterio de la FESI, UNAM por su invaluable colaboración en la experimentación con animales.

ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	i
Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	iii
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 Nanotecnología y nanomateriales	2
2.1.1 Definición de nanomateriales.....	2
2.1.2 Usos de nanomateriales	3
2.1.3 Producción y manufacturación de nanomateriales.....	4
2.1.4 Clasificación de nanomateriales	5
2.2 Exposición a nanopartículas	7
2.2.1 Límites de exposición ocupacional	10
2.3 Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas.....	11
2.3.1 Mecanismos de toxicidad	14
2.4 Traslocación de nanopartículas al torrente sanguíneo.....	15
2.4.1 Descripción de células del torrente sanguíneo	16
2.4.2 Distribución y acumulación de nanopartículas en tejidos	19
3. Antecedentes	21
4. Justificación.....	23
5. Hipótesis	25
6. Objetivo general.....	26
6.1 Objetivos generales.....	26
7. Materiales y métodos	27
7.1 Preparación de nanopartículas	27
7.2 Animales y tratamientos	27
7.3 Análisis de parámetros hematológicos	28
7.3.1 Análisis del hematocrito.....	28
7.3.2 Concentración de hemoglobina	28

7.3.3 Conteo de leucocitos totales.....	28
7.3.4 Conteo diferencial.....	28
7.4 Cultivos primarios.....	29
7.5 Análisis estadísticos.....	30
8. Resultados.....	31
8.1 Caracterización de nanopartículas.....	31
8.2 Peso corporal del modelo <i>in vivo</i>	32
8.3 Alteraciones en parámetros hematológicos.....	33
8.4 Viabilidad celular en cultivos primarios.....	41
9. Discusión.....	43
10. Conclusiones.....	54
11. Direcciones futuras.....	55
12. Referencias.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de NMs en escala métrica	3
Figura 2. Producción mundial de NMs	5
Figura 3. Clasificación de NMs	6
Figura 4. Vías de exposición humana a NPs	9
Figura 5. Factores fisicoquímicos de las NPs	12
Figura 6. Esquema del aparato circulatorio; ubicación de hígado y bazo	19
Figura 7. Modelo de administración de NPs en cultivo primario de hígado o bazo	29
Figura 8. Imágenes SEM de TiO ₂ , SiO ₂ e ITO NPs	31
Figura 9. Porcentaje del hematocrito	33
Figura 10. Concentración de hemoglobina.....	34
Figura 11. Conteo de leucocitos totales	35
Figura 12. Conteo de diferencial de neutrófilos	36
Figura 13. Conteo diferencial de eosinófilos	37
Figura 14. Conteo diferencial de basófilos	38
Figura 15. Conteo diferencial de linfocitos	39
Figura 16. Conteo diferencial de monocitos	40
Figura 17. Viabilidad celular en cultivo primario de hígado	41
Figura 18. Viabilidad celular en cultivo primario de bazo.....	42
Figura 19. Rutas de interacción entre NPs y células sanguíneas.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Límites de exposición ocupacional.....	11
Tabla 2. Tipos de leucocitos	17
Tabla 3. Caracterización de TiO ₂ , SiO ₂ e ITO NPs.....	31
Tabla 4. Peso corporal de ratas Wistar	32
Tabla 5. Fases de la respuesta inmune	48

1. RESUMEN

Los nanomateriales (NMs) como el dióxido de titanio (TiO₂), el dióxido de sílice (SiO₂) y óxido de indio y estaño (ITO) tienen aplicaciones importantes principalmente en productos alimenticios, pinturas, pantallas táctiles entre otros. Los trabajadores son susceptibles en ambientes ocupacionales durante la fabricación de estas NPs, donde son inhaladas y pasan al torrente sanguíneo, esto permite la distribución y acumulación en diferentes órganos. El objetivo de este trabajo fue evaluar las alteraciones en sangre a 1 y 7 días de ratas expuestas intravenosamente con una dosis única de 2.5 mg/kg de TiO₂, SiO₂ e ITO NPs. Se midieron los parámetros hematológicos tales como hematocrito, hemoglobina, leucocitos. Se realizaron cultivos primarios de hígado y bazo para determinar la viabilidad celular con el fin de evaluar qué órgano era el más susceptible a la exposición de NPs. Los hallazgos indicaron que los 3 tratamientos con NPs reducen la concentración de hemoglobina y el número total de leucocitos, principalmente el grupo administrado con ITO NPs. Los neutrófilos y los linfocitos fueron los mayormente alterados después de 1 y 7 días respectivamente. Los 3 tratamientos con NPs disminuyeron la viabilidad celular en hígado y bazo tanto con la administración intravenosa como con la exposición *in vitro* por separado, pero al combinar ambos métodos de exposición de NPs (intravenosa + *in vivo*) provocan resistencia celular tanto en el cultivo primario de hígado como en el de bazo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Nanotecnología y nanomateriales

La nanotecnología es la ciencia empleada para estudiar el desarrollo de materiales de tamaño nanométrico, generando innovaciones tecnológicas y proporcionando nuevas propiedades fisicoquímicas teniendo en consideración su impacto social y ambiental. Estos nanomateriales (NMs) son un producto de creciente importancia ya que están presentes en industrias tradicionales y en ámbitos muy diversos que incluyen desde la industria aeroespacial, la electrónica, la cosmética, la alimenticia e inclusive hasta el desarrollo de nuevos tratamientos médicos, medicamentos y herramientas biomédicas. Conjunta ciencias como la física, la biología, la química, la ingeniería entre otras (Gutiérrez *et al.*, 2009).

2.1.1 Definición de nanomateriales

Los NMs se definen como un material que contiene nanopartículas (NPs), en un estado no unido, como un agregado o como un aglomerado donde una o más de sus dimensiones externas están en el rango de tamaño de entre 1 nm y 100 nm (Figura 1), donde posee el 50% o más de las NPs en la distribución de tamaño y de número. Aunque existe controversia ya que hay casos específicos donde hay organizaciones que por preocupaciones por el ambiente, la salud, la seguridad o la competitividad, el umbral en la distribución de tamaño de número de 50% puede ser reemplazado por un umbral de entre el 1% y 50% de NPs en la distribución de tamaño de número (European Commission, 2011).

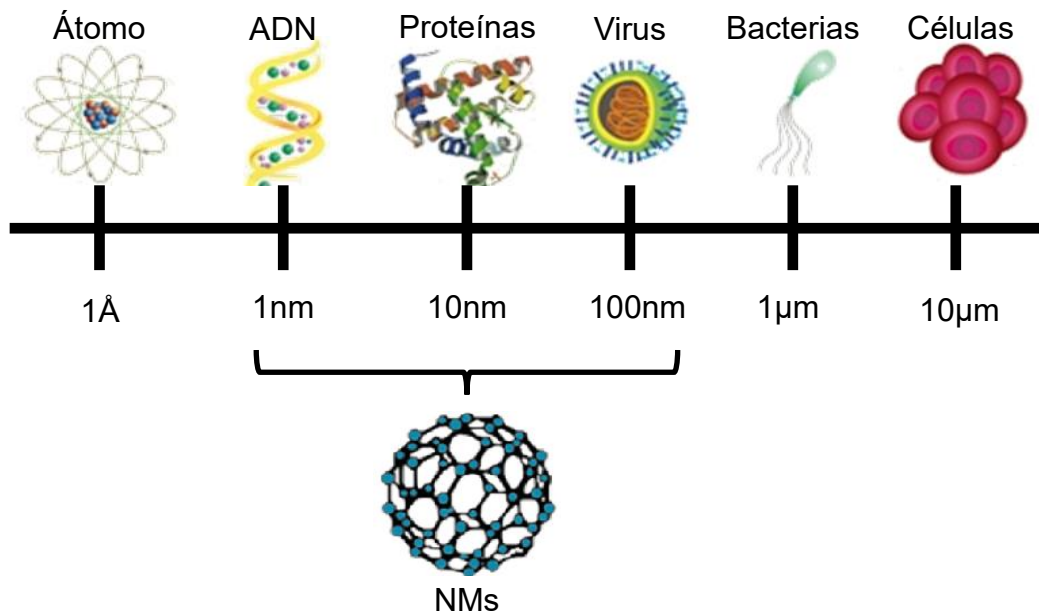


Figura 1. Ubicación de los nanomateriales en la escala de longitud en comparación con diferentes compuestos biológicos.

Existen NMs que son abundantes en la naturaleza y se considera que los seres vivos nos encontramos rodeados de miles de millones de los mismos (Tiwari *et al.*, 2016). Los NMs se pueden presentar de forma natural como cenizas generadas por un volcán, polvo de arena y sustancias generadas por el plancton oceánico, o incidental como humos de productos de combustión, fumarolas de volcanes e incendios. El término “nanomaterial” también incluye los NMs manufacturados diseñados intencionadamente con propiedades específicas incluyendo las mecánicas, eléctricas, ópticas, catalíticas entre otras (INSHT, 2015).

2.1.2 Usos de nanomateriales

La utilización de productos que contienen NMs está introducida en la mayoría de los sectores industriales. Entre las aplicaciones más destacadas se encuentran productos de la industria alimenticia, energética, medicinal, de construcción y la aeroespacial, por mencionar algunas. Es probable que en muchos de los productos que usamos en nuestra vida cotidiana contengan NMs

manufacturados. Por ejemplo las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO_2 NPs) son usadas para la producción de desinfectantes, desodorantes, pastas de dientes, aditivos alimenticios, humidificadores, protectores solares y recientemente en polvos antimicrobianos para la purificación de aguas (Pichat, 2014). Otras NPs que han sido aplicadas ampliamente son las nanopartículas de dióxido de sílice (SiO_2 NPs) que se usan en aditivos alimenticios, excipientes para medicamentos y cosméticos (Athinarayanan *et al.*, 2014). De las NPs más recientes se encuentran las nanopartículas de óxido de indio y estaño (ITO NPs) que se utilizan para la fabricación del recubrimiento transparente en pantallas planas, pantallas táctiles y celdas fotovoltaicas, en la elaboración de dispositivos electrónicos y difusores de luz en LEDs (Falk, 2012).

2.1.3 Producción y manufacturación de nanomateriales

En los últimos años, las NPs manufacturadas han tenido un aumento a nivel mundial en materiales y productos de aplicación industrial; en diferentes ámbitos sobre todo en el laboral, que está relacionado con sectores energéticos, médicos, alimenticios, textiles, electrónicos, de agricultura, cosméticos, entre muchos otros (Murashov *et al.*, 2012). Las TiO_2 NPs y las SiO_2 NPs destacan ya que llegan a tener una producción mundial de hasta 10,000 y 100 toneladas al año respectivamente (Figura 2). Otras NPs que no son producidas enormemente pero que si están teniendo un gran auge y son de las más recientes son las de óxido de indio y estaño (ITO NPs) (Kazuyuki *et al.*, 2011).

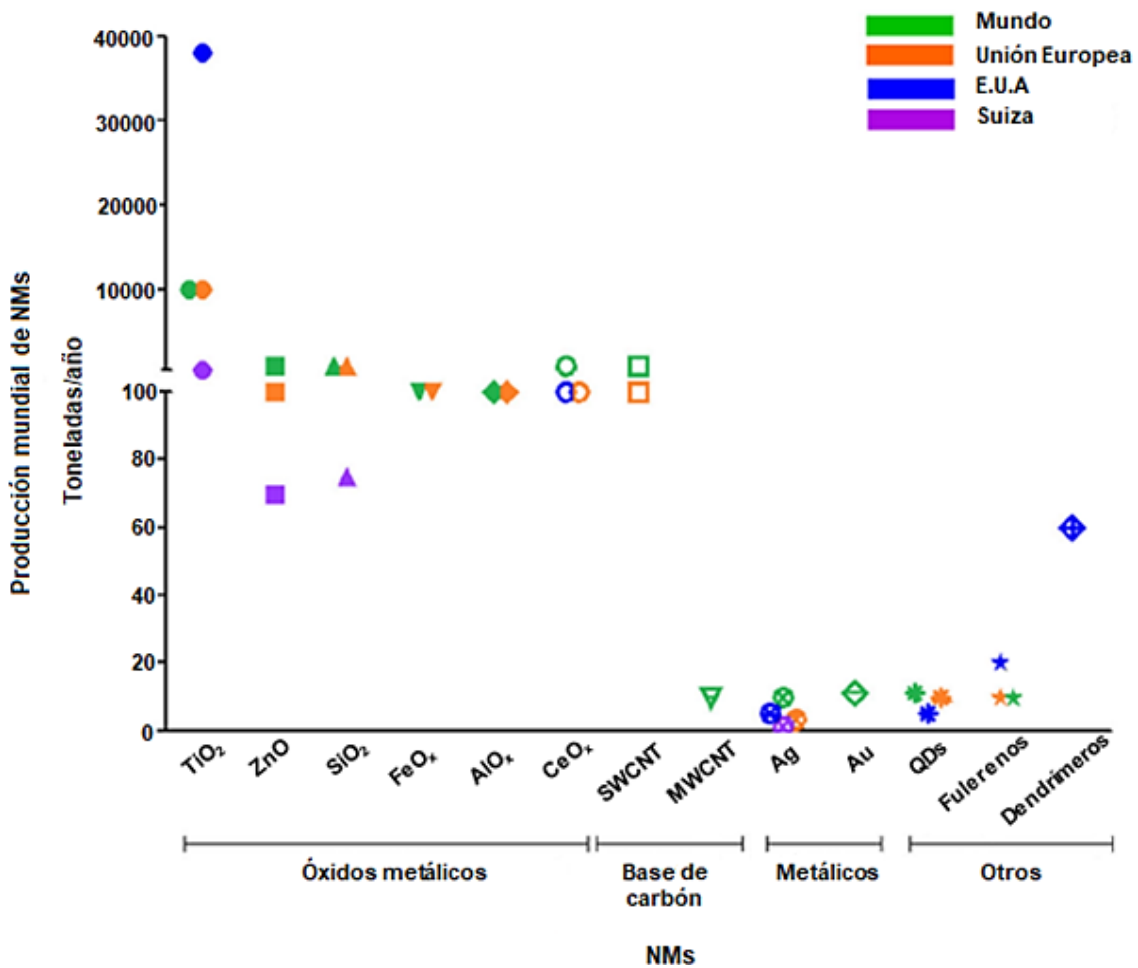


Figura 2. Nanomateriales (NMs) producidos en todo el mundo. La producción de NMs (toneladas/año). Los principales NMs producidos son TiO₂ (dióxido de titanio), ZnO (óxido de zinc), SiO₂ (óxido de sílice), FeO_x (óxido de hierro), AlO_x (óxido de aluminio) y CeO_x (óxido de cesio), SWCNT (nanotubos de carbono de pared simple), MWCNT (nanotubos de carbono de varias paredes), nanopartículas de plata (Ag), nanopartículas de oro (Au), Quantum dots (QD), fullerenos y dendrímeros. Modificado de Garduño-

2.1.4 Clasificación de nanomateriales

Los NMs pueden ser clasificados de acuerdo a su composición química, entre los cuales se encuentran, los de base de carbón, los metálicos, óxido metálicos y metaloides (OM), las quantum dots (QDs), los dendrímeros, los de base lipídica y los basados en biomoléculas (Figura 3; Medina *et al.*, 2017).

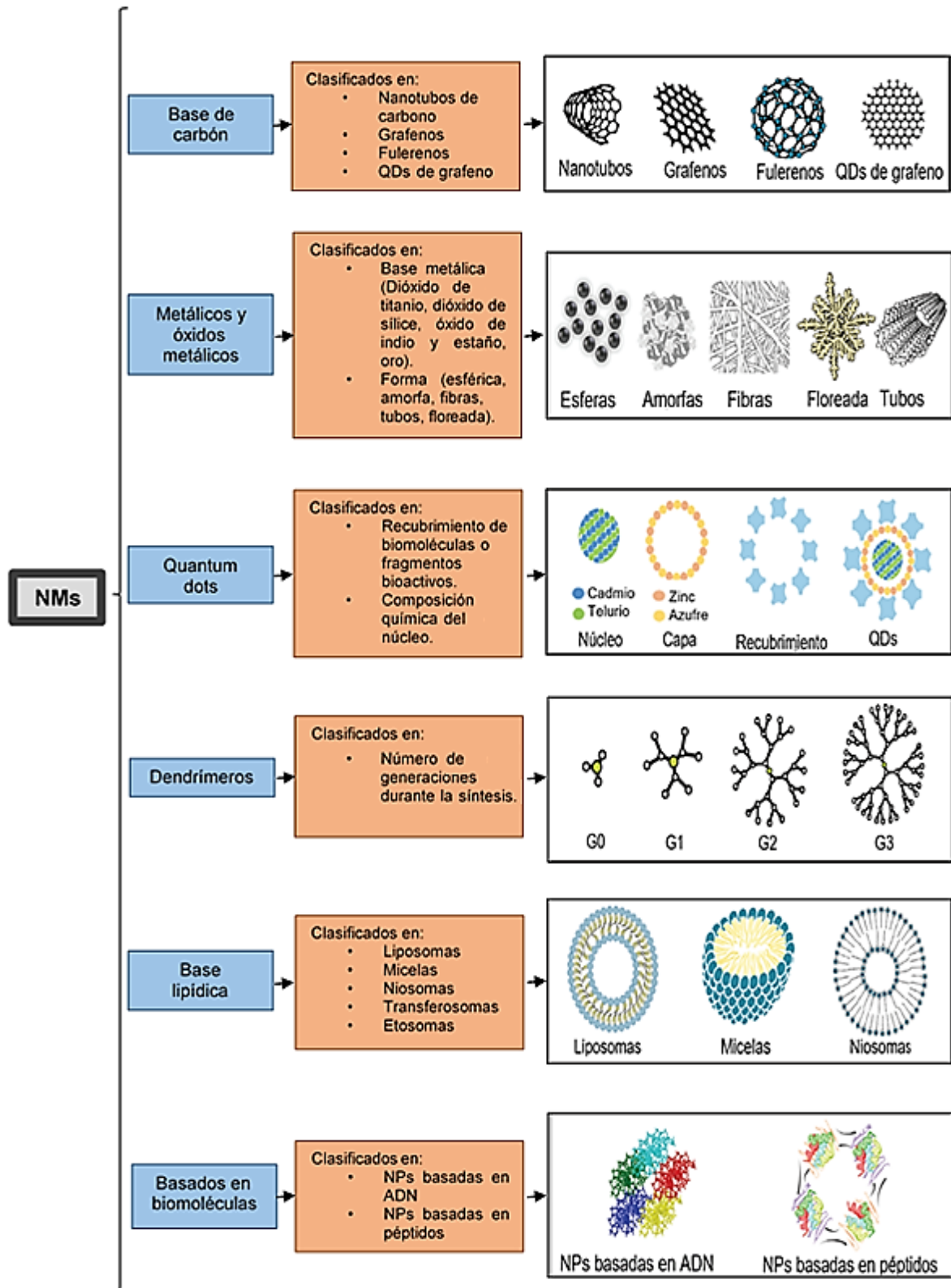


Figura 3. Clasificación de nanomateriales con base en su composición química. Modificado de Medina *et al.*, 2017.

La Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos por sus siglas en inglés EPA, es una de las agencias que clasifica a dichos NMs y define así a los principales 4 grupos (EPA, 2016):

- Base de carbono: Son moléculas compuestas principalmente de carbón y organizadas en formas específicas como tubos y esferas.
- Dendrímeros: Son moléculas ramificadas que proveen cavidades internas para transportar otras moléculas y pueden estar funcionalizados en su superficie. También son utilizados en recubrimientos.
- Metálicos y óxidos metálicos/metaloides (OM): Son generalmente NPs compuestas de uno o dos metales.
- Quantum dots: Son semiconductores cristalinos, usualmente de metal que al ser manipulado su tamaño puede resultar en diferentes colores fluorescentes (Wang *et al.*, 2006).

2.2 Exposición a nanopartículas

La exposición humana a NPs se puede dar a través de diferentes vías de las cuales las más relevantes son la dérmica, la oral y la inhalatoria aunque no son las únicas (Figura 4).

La vía de exposición dérmica de NPs se presenta principalmente mediante el uso de cosméticos y protectores solares que las contienen. Se han realizado diversos estudios para determinar si las NPs se pueden absorber a través de la piel, encontrándose que algunas como las TiO₂ NPs no pueden atravesar el estrato córneo (Nohynek *et al.*, 2007). Otras NPs como los QDs, no sólo han demostrado atravesar el estrato córneo sino que incluso llegan a acumularse en los folículos pilosos de la dermis (Ryman *et al.*, 2006).

La exposición oral de NPs es principalmente a través de los alimentos dado que las NPs se usan en la industria alimenticia para mejorar la seguridad de los mismos, extender la vida de almacenamiento, mejorar el sabor y la entrega de nutrientes, el empaquetado y también como aditivo (He y Hwang, 2016). Un ejemplo de un aditivo alimenticio altamente empleado es el TiO_2 , que recibe el nombre de E171 según la designación de la Unión Europea. Se utiliza en diversos alimentos para darles color blanco, brillo u opacidad y también es usado en productos farmacéuticos como excipiente. El E171 es utilizado en México en la elaboración de harinas, tortillas, helados, quesos frescos y procesados, dulces a base de leche y cremas (Rodríguez, 2016). Después de que las NPs son ingeridas pasan por el tracto gastrointestinal o también llamado digestivo, que abarca la faringe, el esófago, el estómago y el intestino, llegando en este último es donde son absorbidas las NPs y después traspasan la barrera intestinal llegando así al torrente sanguíneo donde se distribuyen a diversos tejidos (Ávalos *et al.*, 2013).

En la vía de exposición inhalatoria las NPs están presentes en el uso de productos como aerosoles pero principalmente son provenientes de procesos industriales (Kyung y Hyeon, 2013). Tras la inhalación, las NPs se depositan en la cavidad nasal, la región alveolar y en los ganglios linfáticos de los pulmones y posteriormente se eliminan a través del sistema mucociliar y del sistema linfático, donde son absorbidas o degradadas para incorporarse al torrente sanguíneo (Coutiño *et al.*, 2017).

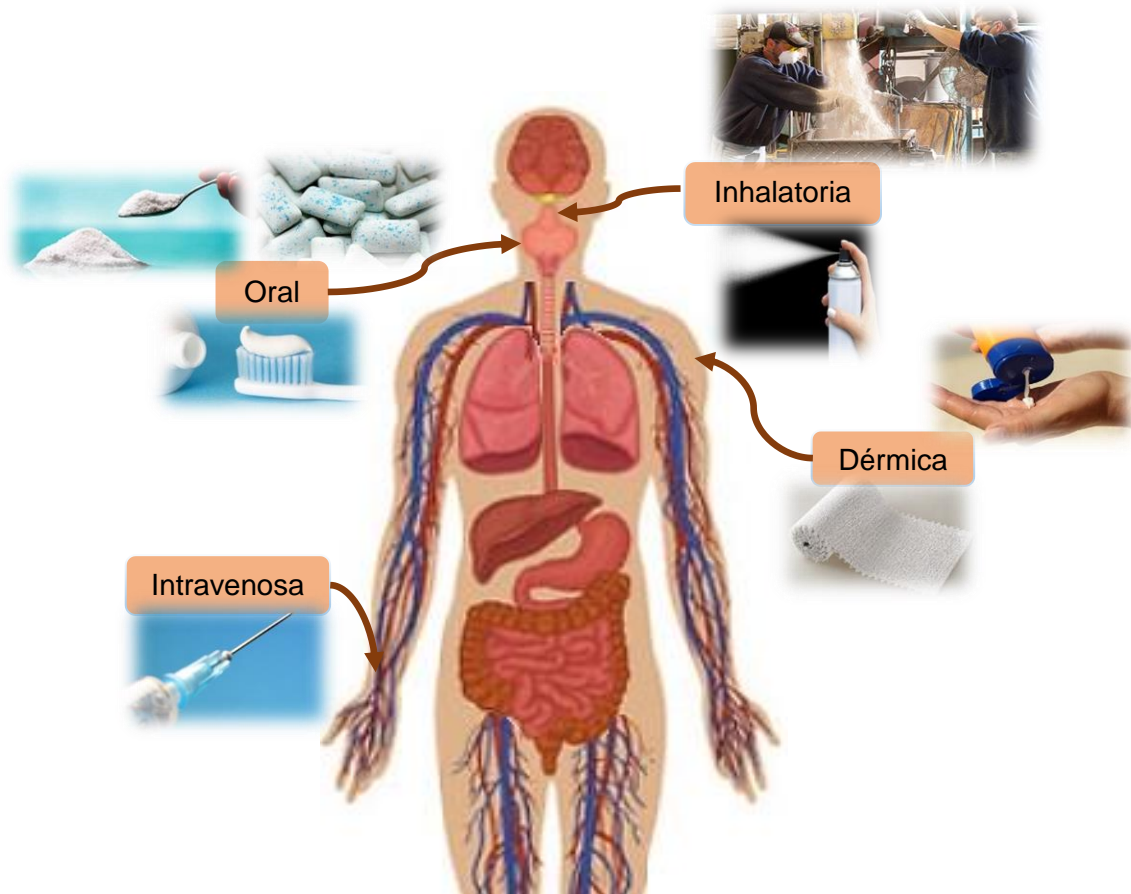


Figura 4. Principales vías de exposición humana a nanopartículas (NPs). Se muestran las vías más destacadas por las cuales las NPs pueden ingresar al cuerpo.

Además de las vías de exposición antes mencionadas existen otras en las que los humanos podemos estar expuestos a las NPs. Por ejemplo la vía intravenosa (I.V.) que se da a través de inyecciones que funcionan en la liberación y/o direccionamiento de fármacos. También existe una forma de exposición que afecta al sistema reproductivo por medio de una variedad de productos comerciales como anticonceptivos y productos de higiene femenina (Ávalos *et al.*, 2013). Inclusive se ha reportado que las NPs pueden ser traslocadas de manera placentaria en donde a las mujeres embarazadas que están expuestas a NPs por cualquier vía, llegan hasta la sangre del feto y pasan a órganos secundarios del mismo como hígado, bazo, intestino entre otros (Gehr, 2018).

Sin embargo lo que ha generado inquietudes sobre los posibles efectos adversos en la salud humana ha sido el aumento en la producción de NPs, especialmente de las OM. En los ámbitos ocupacionales los trabajadores son los mayormente expuestos porque están involucrados en la investigación, desarrollo, fabricación, producción, uso, reciclaje y eliminación de NPs o productos que contienen NPs (Seaton *et al.*, 2010). Estas NPs son inhaladas y absorbidas por las células epiteliales que recubren el tracto respiratorio y también por los receptores olfativos, donde entran directamente en los pulmones. La exposición prolongada de la NPs provocan un riesgo de mortalidad atribuido al cáncer, principalmente de pulmón (Chen *et al.*, 2008; Mossman *et al.*, 2007) y a enfermedades cardiopulmonares (Parveen *et al.*, 2015).

2.2.1 Límites de exposición ocupacional

En ambientes ocupacionales la exposición en trabajadores ocurre al inhalar las NPs durante su manufacturación, manipulación y disposición provocando efectos adversos debido a su depósito en pulmones, lo que causa procesos inflamatorios (Gálvez y Tanarro, 2010; Warheit *et al.*, 2007).

Actualmente existen límites determinados de exposición ocupacional para NPs que son inhaladas por los trabajadores, sobre todo de las OM y metaloides debido a que son de las más producidas (Tabla 1). En el caso de las TiO_2 el Instituto Nacional para la Salud y Seguridad Ocupacional (por sus siglas en inglés NIOSH) recomienda límites de exposición en el aire de 0.3 mg/m^3 (NIOSH, 2016). El límite de exposición establecido para SiO_2 por la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (por sus siglas en inglés OSHA) es de 0.05 mg/m^3 (OSHA, 2016). Para el caso de ITO no se ha establecido un límite de exposición hasta el momento y la única recomendación disponible es para indio

(In) y estaño (Sn), con límites de 0.1 mg/m³ y 2 mg/m³, respectivamente (Indium Corporation, 2018). Cabe mencionar que Indium Corporation no es una agencia de salud ocupacional ni gubernamental pero hasta el momento es la única que ofrece algún tipo de recomendación para estos metales.

Tabla 1. Límites de exposición ocupacional de TiO₂, SiO₂ e ITO NPs recomendados por el NIOSH y la OSHA.	
Compuestos óxido metálicos	Límites de exposición ocupacional 
Dióxido de titanio (TiO₂)	0.3 mg/m ³
Dióxido de silicio (SiO₂)	0.05 mg/m ³
Óxido de indio y estaño (ITO)	No establecido

Como se mencionó anteriormente las NPs ingresan al cuerpo mediante diferentes vías de exposición, e interactúan con componentes biológicos y ejercen diferentes efectos, los cuales dependen en gran medida de las propiedades fisicoquímicas de las NPs (Khan *et al.*, 2017).

2.3 Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas

Existen diversos factores de las NPs que influyen de manera importante en su biodistribución y toxicidad, como lo son el estado de aglomeración, la carga superficial, la composición química, la concentración, el tamaño, la solubilidad y la forma, por mencionar algunas (Figura 5) (Landsiedel *et al.*, 2012).

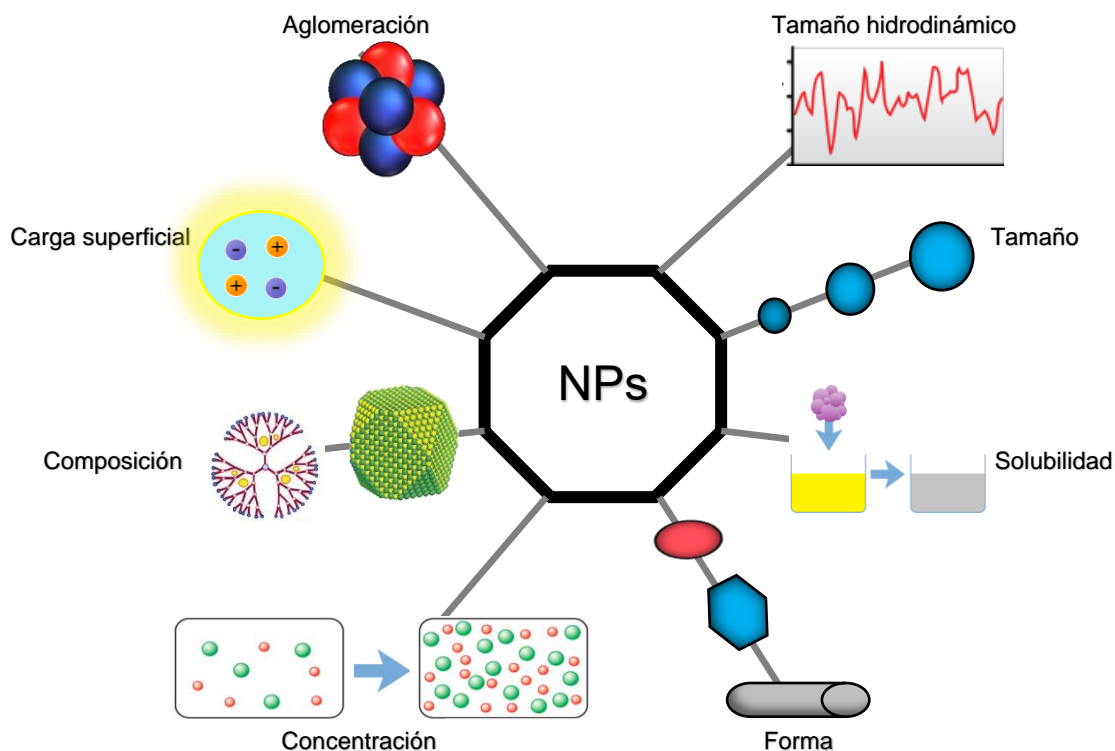


Figura 5. Principales factores fisicoquímicos que influyen en la toxicidad de las nanopartículas.

- **Aglomeración:** Las NPs tienen una tendencia natural a formar agregados o aglomerados (Oberdörster et al., 2005), estos últimos son grupos de partículas unidas mediante fuerzas relativamente débiles de tipo van der Waals, electrostáticas o de tensión superficial, que pueden redispersarse. Esto puede cambiar el lugar de depósito de las NPs en un organismo, ya que un aglomerado de NPs se deposita en distintas zonas debido al distinto tamaño hidrodinámico. Además, también afecta la toxicidad, ya que al ser una estructura relativamente compacta, el área superficial es menor y por tanto la toxicidad también será menor (Gálvez y Tanarro, 2010).
- **Carga superficial:** La caracterización de las NPs se pueden llevar a cabo de la dispersión dinámica de luz (DLS) que permite relacionar el desplazamiento aleatorio de las NPs con el tamaño hidrodinámico de estas. Este diámetro depende principalmente de la fuerza iónica del medio

y de la concentración de la disolución. La DLS incorpora un sistema de medida del potencial zeta que se relaciona con la carga superficial de las NPs y es muy útil para evaluar la estabilidad y el grado de agregación de las NPs. Así, si se obtiene un elevado valor absoluto de potencial zeta, las NPs tenderán a repelerse entre sí y no flocularán. Sin embargo, si las NPs presentan unos bajos valores de potencial zeta estas acabarán floculando ya que no existe ninguna fuerza que lo impida. En general, la línea divisora entre suspensiones estables e inestables se establece en el rango de +30 mV o -30mV (Llinàs y Sánchez, 2014).

- Forma: Existen NPs de diversas formas tales como esferas, tubos, fibras, floreadas, discos entre otras. La forma de la NPs incide en su toxicidad, incluso se ha revisado que hay formas más tóxicas que otras dependiendo su área superficial (Subbeniak, 2016).
- Solubilidad: Las NPs reaccionan de manera distinta cuando se suspenden en diferentes medios acuosos. Por ejemplo, existen NPs insolubles como el TiO_2 , algunas de mediana solubilidad como SiO_2 y otras solubles como el ZnO (Feng et al., 2015).
- Tamaño: es de las propiedades más importantes de las NPs ya que la toxicidad de las mismas depende del tamaño. Cuando las NPs son muy pequeñas pueden entrar más fácilmente al cuerpo humano que partículas de más grandes. Esto puede influir tanto en la distribución tisular como en la captación celular de NPs. Por ejemplo, las NPs de alrededor de 5 nm pueden ser más fácilmente fagocitadas que aquellas de 80 nm que en suspensión forman aglomerados de más de 500 nm (Ramakrishna y Pragna, 2011).

2.3.1 Mecanismos de toxicidad

La toxicidad de las NPs se debe a su relación con varios procesos biológicos. Por ejemplo, las NPs pueden ser internalizadas en las células a partir de mecanismos como difusión pasiva, pinocitosis y fagocitosis en donde se da la captación de material extracelular a través de la membrana plasmática. En esta última, las regiones localizadas se envuelven alrededor del material a internalizar, se pliegan y se desprenden para formar vesículas. Las diferencias entre las vías de internalización de la fagocitosis y la pinocitosis depende del tamaño de las vesículas: la primera implica la ingestión de partículas grandes por vesículas grandes (fagosomas), mientras que la última implica la ingestión de fluidos y solutos a través de pequeñas vesículas pinocitóticas (Panariti *et al.*, 2012).

Otro proceso destacado es la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la inducción de estrés oxidativo (EO) (Chernousova *et al.*, 2013). El EO se define como la perturbación en el balance prooxidante-antioxidante en favor del prooxidante provocando un daño potencial. Un aspecto particular del EO es la producción de ERO que incluyen a los radicales libres, al oxígeno singulete, al peróxido de hidrógeno, entre otros (Halliwell y Gutteridge, 2015). Las NPs de varios tamaños y formas pueden acumularse en las mitocondrias después de interactuar con las células. Esta acumulación puede dañar directamente la membrana mitocondrial e interrumpir la función de la cadena respiratoria. Como este último es uno de los sitios principales para la generación de ERO, cualquier perturbación de esta cadena de transporte de electrones puede resultar en una mayor producción de ERO (Feng *et al.*, 2015). El EO induce un desacoplamiento del transporte de electrones y la desactivación de enzimas como el α -

cetoglutarato deshidrogenasa, el piruvato deshidrogenasa, la fumarasa entre otras, lo que conduce a la muerte celular ya sea por apoptosis o necrosis (Halliwell y Gutteridge, 2015). Las alteraciones como la disrupción de membranas, la formación de ERO, la liberación de componentes tóxicos, entre otros tienen como consecuencia daños a niveles sistémicos provocando genotoxicidad, esto puede resultar en la inducción o promoción de carcinogénesis (Bailon y Romero, 2016).

Las reacciones inflamatorias también han sido señaladas como un mecanismo implicado en la toxicidad de las NPs ya que se ha demostrado que provocan inflamación al depositarse y acumularse en los tejidos, esto está altamente relacionado con la producción de ERO (Gutiérrez *et al.*, 2009).

Debido a todas las características mencionadas se ha revisado que las NPs poseen la capacidad de causar daño al ADN, incrementar la producción de ERO, dañar la membrana del retículo endoplásmico (Luo *et al.*, 2015), y causar apoptosis y necrosis en diferentes células e inflamación en tejidos (Panas *et al.*, 2013).

2.4 Traslocación de nanopartículas al torrente sanguíneo

En ambientes ocupacionales la vía respiratoria es la principal ruta por la cual ingresan las NPs, tras su inhalación, se depositan en la cavidad nasal, en los ganglios linfáticos pulmonares y en la región alveolar de los pulmones (Oberdörster, 2001). En ésta última región las NPs acumuladas se pueden redistribuir a través de 3 rutas importantes; a través del sistema mucociliar a lo largo del tracto traqueobronquial, a través del sistema linfático y/o a partir de la traslocación al tejido. Independientemente de cualquiera de estas rutas las NPs se incorporan al torrente sanguíneo (Takenaka *et al.*, 2001).

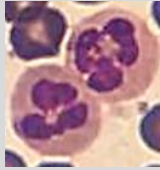
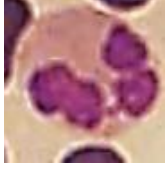

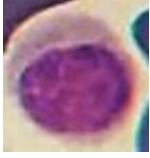
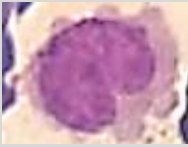
2.4.1 Descripción de células del torrente sanguíneo

Como todos los tejidos del organismo la sangre se encarga de diversas funciones fundamentales como la defensa ante infecciones, intercambios gaseosos y distribución de nutrientes entre muchas otras. Es importante resaltar que la mayoría de las células que componen la sangre se producen en la médula ósea. La sangre se considera como un tejido “renovable” del cuerpo humano, esto se refiere que órganos como la médula ósea, los ganglios linfáticos y el bazo se encuentran produciendo células sanguíneas, ya que éstas tienen un tiempo limitado de vida y, ante determinadas situaciones de salud, puede aumentar su producción (Turgeon, 2004). Existen 3 tipos principales de células en el torrente sanguíneo:

- Eritrocitos: también llamados glóbulos rojos, son las células más numerosas de la sangre. La hemoglobina es uno de sus principales componentes, y su función es transportar el oxígeno hacia los diferentes tejidos del cuerpo. Los eritrocitos constituyen alrededor del 45 % total de la sangre, a esa magnitud porcentual se le conoce como hematocrito (fracción celular). La vida celular de los eritrocitos es de 100 a 120 días (Musso, 2014).
- Plaquetas: También conocidos como trombocitos son pequeños fragmentos citoplasmáticos, irregulares, carentes de núcleo derivados de la fragmentación de sus células precursoras (megacariocitos). Desempeñan un papel fundamental en la hemostasia (mecanismos para detener procesos hemorrágicos). La vida celular de las plaquetas es de aproximadamente 3 días (Weyrich *et al.*, 2004).

- Leucocitos: También llamados glóbulos blancos, son un conjunto de células ejecutoras de la respuesta inmune, interviniendo en la defensa del organismo contra antígenos. Se originan en la médula ósea y en el tejido linfático (Kaushansky, 2010).

Este último grupo celular mencionado destaca ya que son producidos y derivados de las células multipotenciales en la médula ósea, conocidas como células madre hematopoyéticas. Además de que se encuentran en todo el organismo. Existen 5 tipos de leucocitos (Tabla 2; Handin *et al.*, 2003).

Tabla 2. Leucocitos: apariencia, morfología, tamaño y vida media				
Tipo celular	Imagen microscópica (1000x)	Núcleo	Diámetro (µm)	Vida celular en torrente sanguíneo
Neutrófilo		Multilobulado	10-12	7 horas
Eosinófilo		Bilobulado	10-12	8-12 días
Basófilo		Bilobulado o trilobulado	12-15	Horas-días
Linfocito		Excéntrico	7-15	Años
Monocito		Arriñonado	12-15	3 días

Imágenes obtenidas a través de la técnica de microscopía óptica en campo claro (Motic B series).

Las principales funciones de dichas células son:

- Neutrófilos: defienden al organismo contra infecciones principalmente bacterianas o por hongos al fagocitarlos. Son el tipo celular más encontrado en las fases tempranas de la inflamación aguda.
- Eosinófilos: Actúan contra infecciones parasitarias y también son las células inflamatorias predominantes durante una reacción alérgica.
- Basófilos: Son responsables de las respuestas alérgicas al liberar histamina, provocando vasodilatación. Al igual que los neutrófilos y eosinófilos son conocidos como granulocitos debido a la presencia de gránulos en su citoplasma.
- Linfocitos: se encargan de la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa (o específica), reaccionando frente a microorganismos, células tumorales o antígenos entre otros.
- Monocitos: su principal función es la fagocitosis junto con los neutrófilos, pero son más longevos y además presentan fragmentos de patógenos a linfocitos T para que éstos puedan ser reconocidos de nuevo y ser eliminados.

Cabe resaltar que cuando se describen los valores correspondientes a la cantidad y distribución porcentual de las distintas células de la sangre y la concentración de hemoglobina se conoce como evaluación de parámetros hematológicos (Handin *et al.*, 2003).

2.4.2 Distribución y acumulación de nanopartículas en tejidos

Cuando las NPs llegan al torrente sanguíneo son distribuidas a tejidos como cerebro, corazón, pulmones, riñones, bazo e hígado (Figura 6); siendo estos últimos los principales órganos de acumulación de NPs. Cabe resaltar que el hígado y el bazo son de los órganos con mayor flujo de sangre. Simplemente, la sangre que llega al hígado a través de la vena porta y la arteria hepática constituye del 70 al 75% del flujo sanguíneo, este contiene sangre poco oxigenada y con nutrientes provenientes del tracto gastrointestinal y del bazo (Muñoz, 2011).

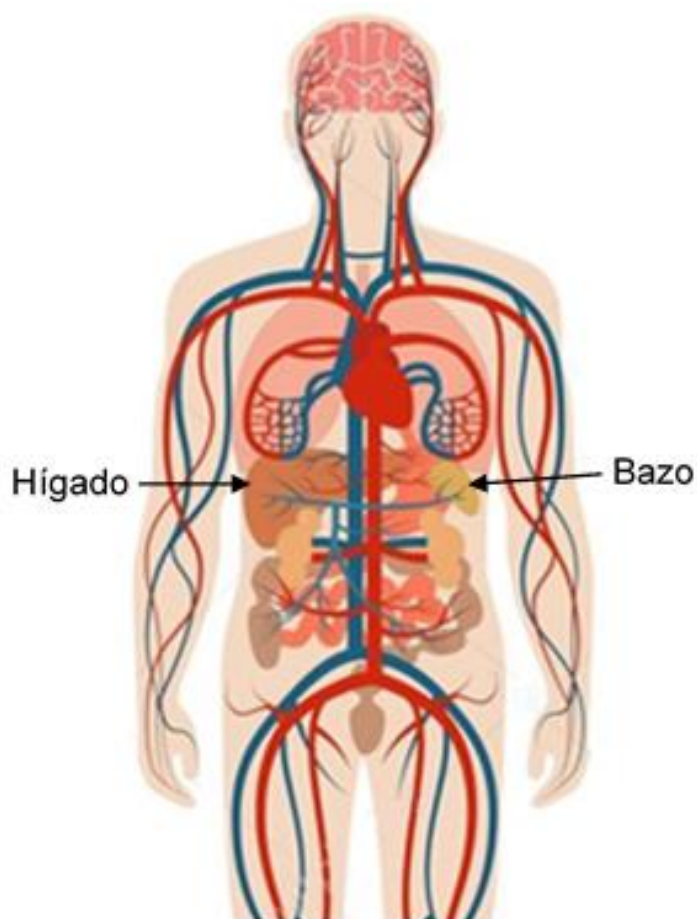


Figura 6. Esquema del aparato circulatorio y ubicación del hígado y bazo.

El hígado se encarga principalmente de segregar la bilis que es esencial para la digestión de los alimentos pero igual cumple con otras funciones, entre ellas la metabolización de la bilirrubina que es una sustancia tóxica que procede de la

degradación de la hemoglobina. Incluso el hígado posee funciones inmunológicas ya que en él existen gran número de células conocidas como células de Kupffer, que son macrófagos residentes en el hígado que fagocitan macromoléculas extrañas al organismo (Miyake *et al.*, 2010).

El bazo ha sido considerado un órgano que está fuertemente relacionado con el hígado. Es un órgano parenquimatoso que desempeña un papel importante en la inmunidad tanto humoral como celular (Tarantino *et al.*, 2013). Sus principales funciones son la maduración y eliminación de eritrocitos (Henry y Thompson, 2005).

Aunque cabe señalar que no todas las NPs siguen el mismo patrón de distribución a los diferentes órganos. Por ejemplo se ha observado las nanopartículas de plata (Ag NPs) se depositan mayormente en pulmón pero esto depende de todos los factores fisicoquímicos que las NPs puedan presentar (Figura 5) (Ávalos *et al.*, 2013). También se encuentran los dendrímeros que sirven transportar otras moléculas y se emplean en la liberación de fármacos para terapias biomédicas (Kolhe *et al.*, 2003).

3. Antecedentes

A continuación, se detallan investigaciones que evalúan los diferentes cambios en parámetros hematológicos y en tejidos por NPs administradas de manera I.V. en diferentes periodos. Las siguientes dosis se reportan como la relación entre la concentración empleada y el peso corporal (BW) body weight por sus siglas en inglés, del modelo animal usado.

Fabian *et al.*, en 2007 administrando intravenosamente una dosis única de 5 mg/kg_{BW} de TiO₂ NPs en ratas Wistar durante 1, 14 y 28 días describieron que no hubo cambios en el número de células sanguíneas, plasma, cerebro ni nódulos linfáticos. Wai *et al.*, en 2017 usaron dosis únicas de 1, 2.5, 5, 10, 100, 200, y 300 mg/kg_{BW} de SiO₂ NPs intravenosamente durante 14 días pero tampoco observaron diferencias en el número de eritrocitos ni de leucocitos con ninguna dosis. En contraste con lo reportado por Elgrabli *et al.*, en 2015 empleando igualmente intravenosamente una dosis única de 5 mg/kg_{BW} de TiO₂ NPs a los 10 minutos, 1, 7, 28 y 56 días después de la exposición y observaron que disminuía el número de leucocitos solamente en los periodos de 28 y 56 días. Por otra parte Xu *et al.*, en 2013 usaron dosis únicas administradas intravenosamente de 0, 140, 300, 645 y 1387 mg/kg_{BW} de TiO₂ NPs reportaron que solamente las dosis de 645 y 1387 mg/kg aumentan el número de leucocitos. Shinohara *et al.*, en 2014 evaluaron la cantidad de TiO₂ en órganos de ratas F334 después de la administración I.V. de 0.95 mg/kg_{BW} en ratas F344/DuCrIj, donde observaron que los principales tejidos de acumulación fueron hígado y bazo, seguidos de pulmones, riñones y corazón. En el caso de ITO NPs aún no se han encontrado trabajos en donde evalúen de manera I.V. los efectos que

podieran tener las NPs en células sanguíneas ni los efectos al acumularse en tejidos.

También es importante señalar, que al igual que en los estudios *in vivo*, existe una gran controversia sobre las concentraciones, métodos utilizados y vehículos de dilución ya que estos pueden influir fuertemente en la interpretación de los resultados. Además, no en todos los estudios se especifican las características de las NPs utilizadas, esto limita también la interpretación y la extrapolación de los resultados de forma que estén más apegados a la realidad.

4. Justificación

A pesar de que en las investigaciones previamente mencionadas usan el mismo método de administración de NPs difieren mucho en cuanto a las dosis y los periodos de evaluación. Se sabe muy poco de los efectos a corto y a largo plazo sobre la salud humana, aunque se ha observado que las NPs manufacturadas pueden causar daños diferentes a las NPs que se presentan de manera natural (Gutiérrez *et al.*, 2013). Las TiO₂ y SiO₂ NPs son de los NMs más producidos a nivel mundial (Figura 2) mientras que otros se perfilan como NMs con gran potencial industrial de manufactura, entre ellos las ITO NPs. Esto implica que dichas NPs sean a las que los humanos podamos estar expuestos, ya sea por vía inhalatoria en sitios de producción industrial o por vía oral, en el caso de alimentos o empaques de alimentos. Por otra parte, una pequeña fracción de las NPs inhaladas puede llegar al tracto gastrointestinal. En ambos casos dichas NPs pueden traslocarse a torrente sanguíneo, lo cual abre la posibilidad de su interacción con los diferentes componentes de la sangre. De forma independiente, algunas NPs pueden llegar directamente a torrente sanguíneo, por ejemplo aquellas usadas en aplicaciones biomédicas. Una vez en torrente sanguíneo, las NPs pueden interactuar con células del sistema inmune como son los neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos. Los efectos de las NPs sobre estas células han sido poco estudiados y usando dosis altas difíciles de alcanzar en condiciones reales de exposición para los humanos. Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se empleó la dosis única de 2.5 mg/kg_{BW} por vía I.V. de TiO₂ y SiO₂ por ser de las NPs de mayor producción a nivel industrial y de ITO por su potencial uso, sobre parámetros hematológicos, ya que al revisar diversos artículos (Disdier *et al.*, 2015; Fabian *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2017;

Sang *et al.*, 2012; Wai *et al.*, 2017 y Xu *et al.*, 2013) se observó que una concentración menor a 1 mg no provoca efectos, además de que concentraciones mayores a 5 mg son consideradas excesivas.

Además existen estudios agudos que muestran algunos cambios en parámetros hematológicos sin embargo se desconoce si dichos cambios son reversibles, se mantienen o se exacerban. Es por ello que los análisis hematológicos se evaluaron después de 1 y 7 días de administración de las diferentes NPs. También influye de manera importante la vida celular, tanto de eritrocitos como de leucocitos y de esto depende el que unas estén más presentes que otras, frente a diferentes patógenos o agentes extraños.

5. Hipótesis

Se ha comprobado que la exposición a diferentes tipos de NPs incluyendo la vía oral e inhalatoria causa translocación de NPs al torrente sanguíneo y dichas NPs se distribuyen en diversos órganos entre ellos el hígado y el bazo. Sin embargo mientras están en el torrente sanguíneo no se sabe si existen alteraciones en poblaciones celulares sanguíneas. La hipótesis de este estudio es que si las TiO_2 , SiO_2 e ITO NPs llegan al torrente sanguíneo por vía intravenosa, entonces se alterarán los porcentajes de eritrocitos y leucocitos en sangre y se afectará la viabilidad de células de hígado y bazo siendo las TiO_2 e ITO NPs las que mayor toxicidad provoquen en ratas Wistar administradas con una dosis única de 2.5 mg/kg_{BW} de TiO_2 , SiO_2 e ITO NPs. Asimismo se esperaría que las alteraciones en torrente sanguíneo se presentaran hasta los 7 días después de la administración de TiO_2 , SiO_2 e ITO NPs.

6. Objetivo general

Evaluar los efectos en los parámetros hematológicos a 1 y 7 días de ratas Wistar expuestas vía intravenosa a nanopartículas de TiO₂, SiO₂ e ITO.

6.1 Objetivos particulares

- Caracterizar el tamaño, la forma y estabilidad de nanopartículas de TiO₂, SiO₂ e ITO.
- Medir el porcentaje del hematocrito por capilaridad en ratas Wistar a 1 y 7 días de administración de nanopartículas de TiO₂, SiO₂ e ITO.
- Calcular la concentración de hemoglobina mediante la técnica de Drabkin en ratas Wistar a 1 y 7 días de administración de nanopartículas de TiO₂, SiO₂ e ITO.
- Cuantificar el número neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos mediante una cuenta diferencial de ratas Wistar a 1 y 7 días de administración de nanopartículas de TiO₂, SiO₂ e ITO.
- Determinar el porcentaje de viabilidad por medio del ensayo de exclusión de Azul Tripano en células vivas de hígado y bazo expuestas a nanopartículas de TiO₂, SiO₂ e ITO.

7. MATERIALES Y MÉTODO

7.1 Preparación de NPs

La caracterización de las mismas se realizó obteniendo imágenes por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM), evaluando el tamaño hidrodinámico y analizando potencial z con un Zetasizer nanoZS90, Malvern Instruments. Se suspendieron 1 mg de NPs en 1 ml de solución salina al 0.9%. Esto se realizó a partir de un stock de 1 mg de TiO₂, SiO₂ e ITO NPs en 1 ml de solución salina al 0.9%.

7.2 Animales y tratamiento

Se obtuvieron ratas Wistar macho de entre 6-8 semanas de edad del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, donde fueron alojadas en un cuarto para animales con una temperatura controlada de 24°C ± 2°C, con un ciclo de luz de 12 h de luz y de oscuridad, con una humedad relativa de 50% ± 10%. Se les proporcionó una dieta *ad libitum* y durante todo el tratamiento los animales fueron pesados antes y después de la dosificación. Se dividieron aleatoriamente en 5 grupos con 5 animales cada grupo: un grupo control, un grupo al que se les administró 200 µl de solución salina al 0.9% y 3 grupos a los que se les administró una dosis única I.V. de 2.5 mg/kg_{BW} de TiO₂, SiO₂ e ITO NPs respectivamente. Después de 7 días se sacrificaron utilizando una sobredosis de 40 mg/_{BW} de pentobarbital sódico. La sangre fue recolectada, por medio de punción cardiaca después de 1 y 7 días de la administración de NPs y el hígado y bazo fueron obtenidos por medio de una autopsia después de 7 días de la administración de NPs.

7.3 Análisis de parámetros hematológicos

Se colocó 1 ml de sangre en tubos eppendorf de 1.5 ml que contenía 200 µl de etileno diamina tetraacético (EDTA) el cual se empleó como anticoagulante. A partir de este stock se realizaron los siguientes análisis.

7.3.1 Análisis del hematocrito

Se llenaron tubos de sangre por capilaridad hasta llegar a $\frac{3}{4}$ partes del mismo, se sellaron con plastilina, se dejaron reposar 24 horas y con una regla se midieron el paquete globular y la longitud del plasma.

7.3.2 Concentración de hemoglobina

Se añadió 2.5 ml de solución de Drabkin a 10 µl de las muestras de sangre en donde fueron leídas en un espectrofotómetro a 540 nm y los datos obtenidos se multiplicaron por el factor de dilución de la solución.

7.3.3 Cuento de leucocitos totales

Se colocaron 10 µl de sangre y 90 µl de diluyente de Türk en un tubo de 500 µl donde se resuspendieron y se colocaron 10 µl en una cámara de Neubaüer, donde fueron contados.

7.3.4 Cuento diferencial

Se realizaron frotis sanguíneos colocando 10 µl de sangre en la parte media de un extremo del portaobjetos, con el borde liso de otro portaobjetos se tocó la muestra de sangre dejándose difundir por capilaridad y se deslizó suavemente extendiendo la muestra por todo el portaobjetos. Después los portaobjetos fueron fijados en alcohol por 3 minutos, después teñidos con colorante Giemsa (WG32-1L, Sigma-Aldrich) durante 2 minutos y se enjuagaron con agua destilada para ser observados empleando microscopía óptica al 100x donde se realizó el

conteo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos. Dichos parámetros fueron medidos después de un día y a después de 7 días de la exposición a las NPs.

7.4 Cultivos primarios

Para evaluar la proliferación de las células de hígado y bazo, se empleó una parte de hígado y bazo y fueron colocados en medio de transporte que contenía medio RPMI 1640 (R4130, Sigma-Aldrich), 5% de suero de ternera y 1% de antibiótico y antimicótico (15240-062, Gibco). Después el hígado y bazo fueron homogeneizados en 5 ml de medio de transporte, posteriormente se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de medio de cultivo (medio RPMI 1640 + 10% de suero de ternera y 1% de antibiótico y antimicótico). Finalmente se sembraron 100,000 células en cajas de 24 pozos donde se les administró $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ de TiO_2 , SiO_2 e ITO NPs después de 24 h de la siembra y a los 3 días de la administración de NPs se contaron las células vivas por medio del ensayo de exclusión de Azul Tripano.

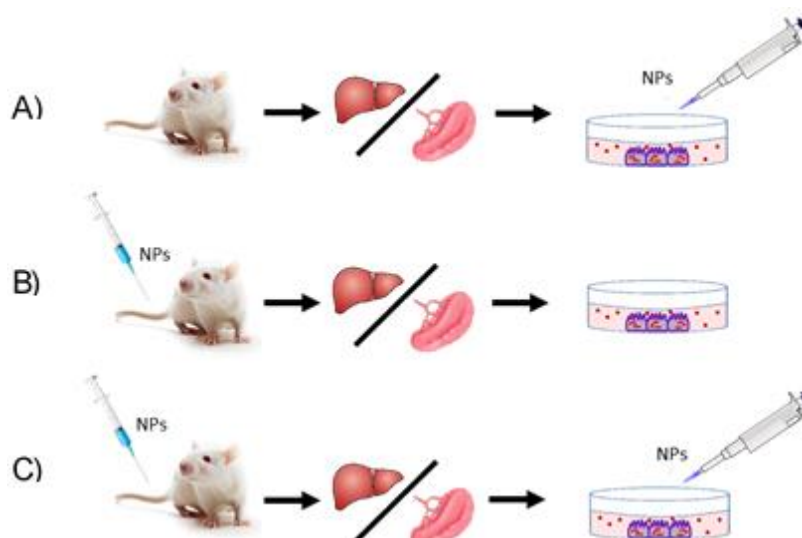


Figura 7. Modelo de administración de TiO_2 , SiO_2 e ITO NPs de manera *in vitro* y/o I.V. en cultivo primario de hígado o bazo. A) De un animal sin previa administración de NPs se obtiene el hígado o bazo y ya con el cultivo primario preparado se le administra las NPs. B) El animal es administrado vía I.V. con NPs, se obtiene el hígado o bazo y se prepara el cultivo primario C) El animal es administrado vía I.V. con NPs, se obtiene el hígado o bazo, se prepara el cultivo primario y en el mismo se vuelve a exponer a NPs.

7.5 Análisis estadísticos

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos se presentaron como media \pm SD obtenida de 2 experimentos independientes. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor P sea <0.05 . Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism (Versión 5.1).

8. Resultados

8.1 Caracterización de nanopartículas

Las imágenes obtenidas por SEM donde muestran las TiO₂, SiO₂ e ITO NPs con una morfología en bandas, esférica y amorfa respectivamente (Figura 8).

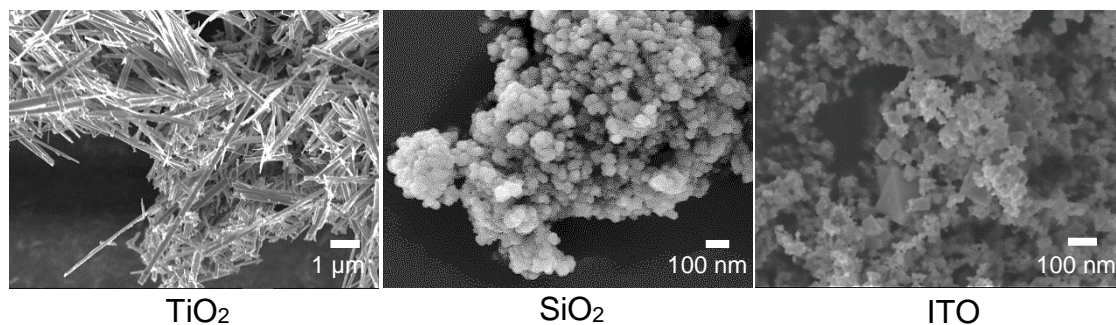


Figura 8. Imágenes de nanopartículas óxido metálicas suspendidas en solución salina por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las NPs fueron suspendidas en solución salina. Se valoró el tamaño hidrodinámico, siendo el más grande el de SiO₂ NPs (499.1±38.1 nm) indicando las dimensiones de los componentes aglomerados interaccionando en el medio suspendido. El índice de polidispersión fue de 0.9 en el caso de TiO₂ e ITO NPs y de 0.8 SiO₂ NPs indicando la frecuencia de tamaño en la muestra. El potencial zeta más destacado fue de ITO NPs (-12.5 mV) refiriéndose a la estabilidad de la suspensión de NPs en el medio (Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización de nanopartículas en solución salina.

	TiO ₂ NPs	SiO ₂ NPs	ITO NPs
Tamaño hidrodinámico (nm)	258.4±4.7	499.1±38.1	316±41.8
Índice de polidispersión	0.9	0.8	0.9
Potencial z (mV)	-3.9	-6.2	-12.5

8.1 Peso corporal del modelo *in vivo*

En el peso de obtenido de ratas Wistar se observa una disminución del peso de los animales en los 3 grupos administrados con NPs a los 7 de exposición I.V con respecto al grupo control a los 7 días. En el grupo administrado con TiO₂ NPs los animales bajan 84 g, para el grupo con SiO₂ NPs decremetan 78 g y para el grupo con ITO NPs disminuye hasta 108 g del peso corporal (Tabla 4).

Tabla 4. Peso corporal de ratas Wistar durante el estudio			
	0 h	1 día	7 días
Control	323.94±28.47	329.78±29.99	363.46±25.94
Solución salina	349.5±35.13	359.06±33.38	389.24±43.40
TiO₂ NPs	328±20.88	334.74±32.82	279.8±8.7*
SiO₂ NPs	360±34.77	356.04±36.06	285.66±38.17*
ITO NPs	318.44±25.19	306.82±30.78	255.05±33.41*

El peso está expresado en gramos (g) al inicio del estudio y después 1 y 7 días de exposición a TiO₂, SiO₂ e ITO NPs. *p<0.05 vs control.

8.3 Alteraciones en parámetros hematológicos

Se observa el porcentaje del paquete globular representado por el volumen que ocupan solamente los glóbulos rojos con relación al total de la sangre. En el tratamiento de SiO₂ NPs el hematocrito aumenta un 31% después de un día (barras rojas; *p<0.05 vs control) y disminuye un 34% después de 7 días (barras rojas; +p<0.05 vs solución salina). En el caso del grupo tratado con ITO NPs disminuye en un 33% (barras verdes; **p<0.01 vs control) y un 34% después de 7 días (barras verdes; +p<0.05 vs solución salina) (Figura 9).

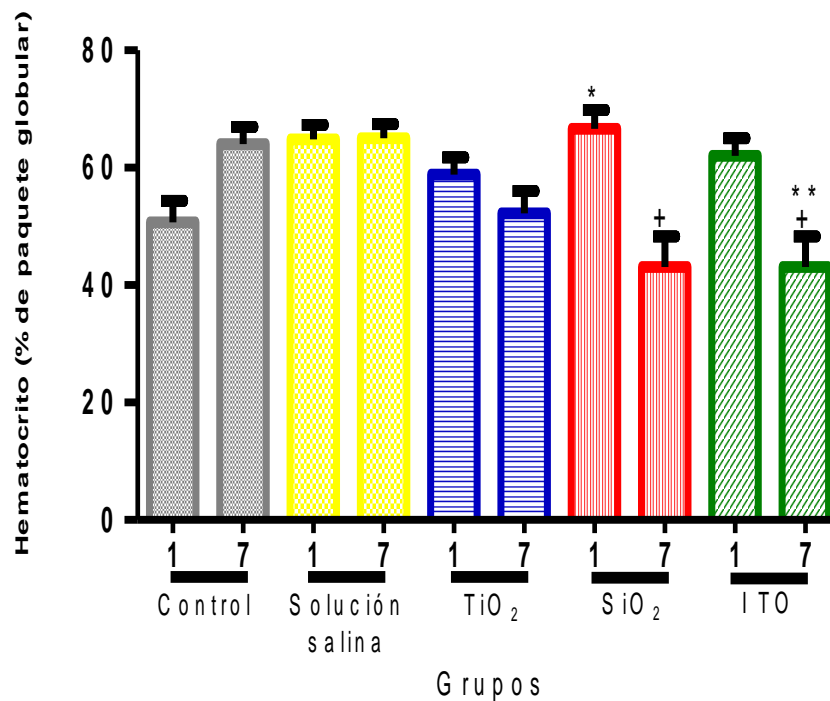


Figura 9. Porcentaje del paquete globular representado por el volumen que ocupan los glóbulos rojos. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar, n=3-5 de dos experimentos independientes. Parámetros medidos a 1 y a 7 días después de la administración de 2.5 mg/kg de nanopartículas. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 vs solución salina.

En la concentración de hemoglobina obtenida se observa un decremento con TiO₂ NPs del 26% (barras azules; **p<0.01 vs control) y del 25% después de 7 días (barras azules; ++p<0.01 vs solución salina). Con el grupo tratado con SiO₂ NPs igualmente disminuyó en un 23% (barras rojas; **p<0.01 vs control) y un 22% después de 7 días (barras rojas; *p<0.05 vs solución salina). En el caso del grupo administrado con ITO NPs disminuyó un 44% después de un día (barras verdes; **p<0.01 vs control) y después de 7 días (barras verdes; ***p<0.001 vs control) e igualmente disminuyó un 46% después de un día (barras verdes; ++p<0.01 vs solución salina) y un 43% después de 7 días (barras verdes; ***p<0.001 vs solución salina) (Figura 10).

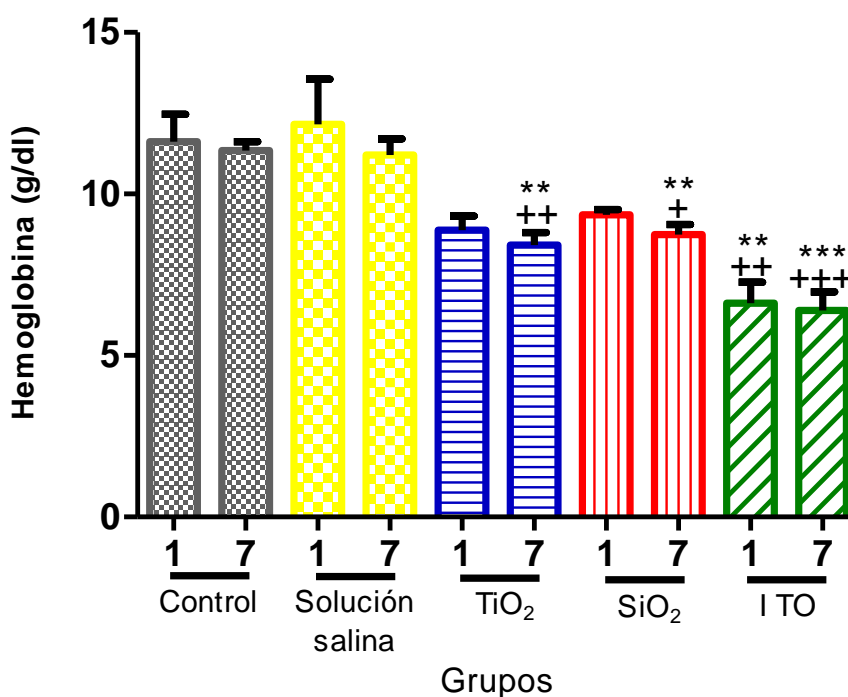


Figura 10. Concentración de hemoglobina expresada en g/dl (proteína sobre volumen total de sangre). Los datos se presentan como promedio ± error estándar, n=3-5 de dos experimentos independientes. Parámetros medidos a 1 y a 7 días después de la administración de 2.5 mg/kg de nanopartículas. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 vs solución salina.

En los conteos de leucocitos totales se aprecia un decremento en todos los tratamientos con NPs en ambos periodos. Primero, para el grupo administrado con TiO₂ NPs disminuye un 37% después de un día (barras azules; **p<0.01 vs control) y un 43% después de 7 días (barras azules; *p<0.05 vs control) e igual disminuyeron en un 43% al día (barras azules; **p<0.01 vs solución salina) y un 33% a los 7 días (barras azules; ***p<0.001 vs solución salina). En el caso de SiO₂ NPs el número de leucocitos disminuyó un 43% después 7 días (barras rojas; *p<0.05 vs control) y de la misma manera disminuyó en un 29% después de un día (barras rojas; *p<0.05 vs solución salina) y un 33% después de 7 días (barras rojas; ***p<0.05 vs solución salina). Con respecto con el grupo de ITO NPs, los leucocitos disminuyeron un 50% después de un día (barras verdes; ***p<0.001 vs control) y 63% a los 7 días (barras verdes; ***p<0.001 vs control) y un 55% al día (barras verdes; ***p<0.001 vs solución salina) y 66% a los 7 días (barras verdes; ***p<0.001 vs solución salina) (Figura 11).

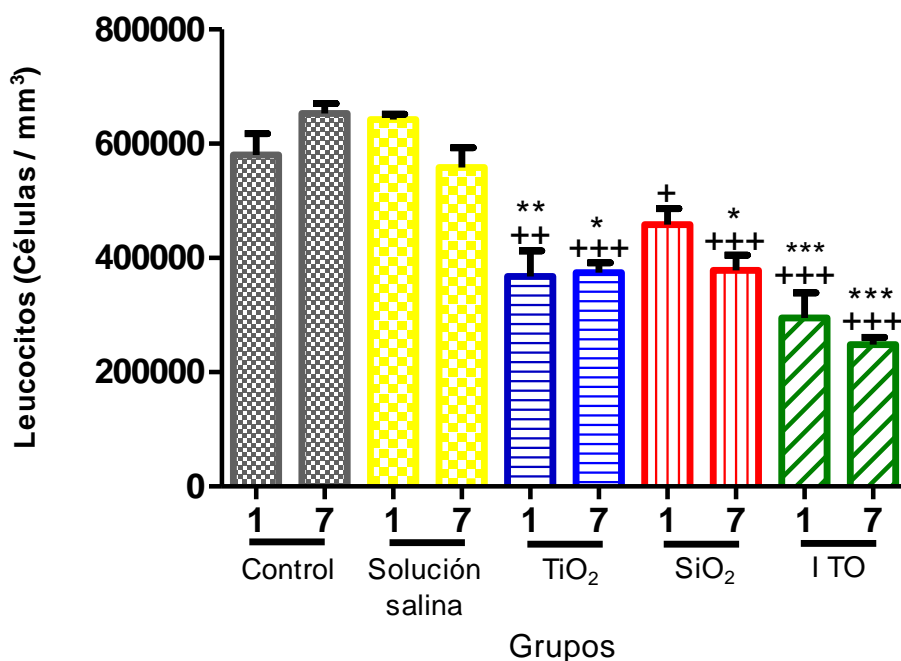


Figura 11. Número total de leucocitos contados por mm³. Los datos se presentan como promedio ± error estándar, n=3-5 de dos experimentos independientes. Parámetros medidos a 1 y a 7 días después de la administración de 2.5 mg/kg de nanopartículas. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 vs solución salina.

En el conteo de neutrófilos se observa un aumento del 44% en el grupo de TiO₂ NPs después de un día (barras azules; ⁺⁺⁺p<0.001 vs control) pero disminuye un 43% después de los 7 días (barras azules; *p<0.05 vs control). Para el grupo de SiO₂ NPs hay un aumento del 40% después de un día (barras rojas; ⁺⁺p<0.01 vs solución salina). En el caso del grupo de ITO NPs hay un aumento de células del 17% (barras verdes; *p<0.05 vs control) y un 50% después de un día (barras verdes; ⁺⁺⁺p<0.001 vs solución salina), pero estos disminuyen un 47% después de 7 días (barras verdes; ^{**}p<0.01 vs control) (Figura 12).

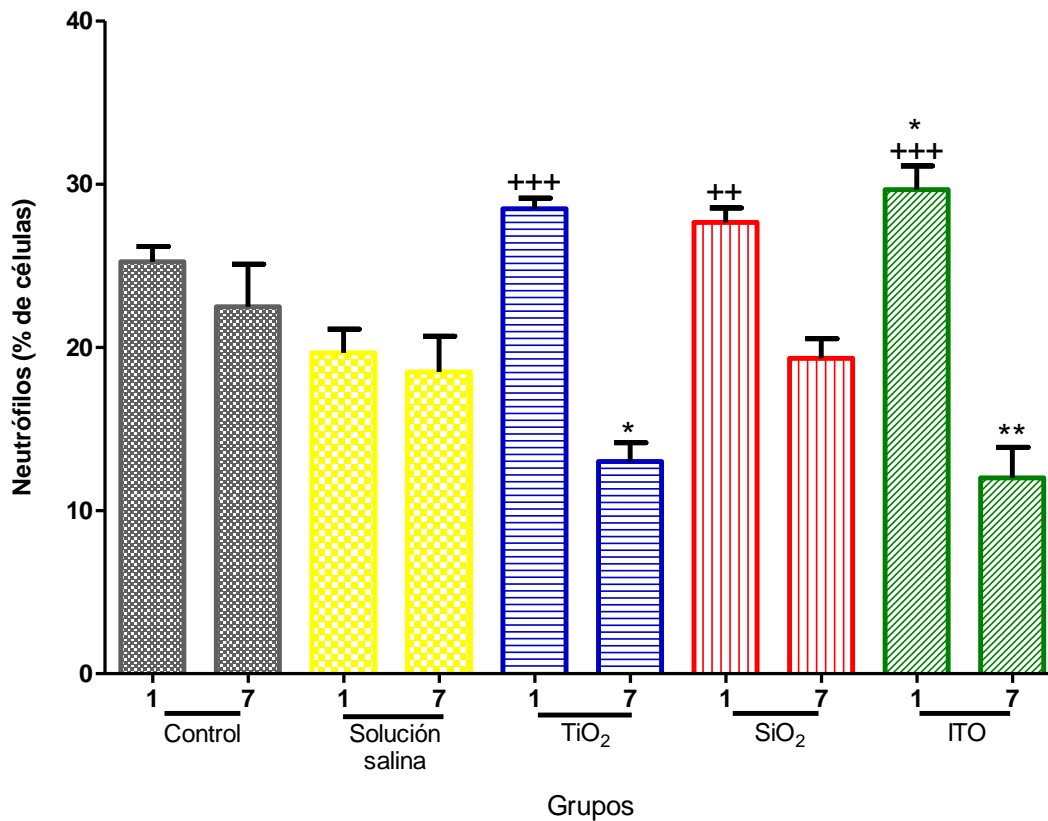


Figura 12. Porcentaje de células contadas en frotis de sangre. Los datos se presentan como promedio ± error estándar, n=3-5 de dos experimentos independientes. Parámetros medidos a 1 y a 7 días después de la administración de 2.5 mg/kg de nanopartículas. *p<0.05, **p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001 vs control; *p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001 vs solución salina.

En el porcentaje obtenido del conteo de eosinófilos se obtuvo en el grupo de TiO₂ NPs disminuye un 46% después de un día (barras azules; *p<0.05 vs solución salina) pero aumenta un 2.6 veces después de 7 días (barras azules; *p<0.05 vs control). Con el grupo de SiO₂ NPs aumenta de la misma manera 2.6 veces (barras rojas; *p<0.05 vs control). Para el caso del grupo de ITO NPs decremantan 8.52 veces (barras verdes; **p<0.01 vs control) y 9.1 veces después de un día (barras verdes; +++p<0.001 vs solución salina), aunque aumentan 3 veces después de los 7 días (barras verdes; **p<0.01 vs control) y 1.8 veces (barras verdes; *p<0.05 vs solución salina) (Figura 13).

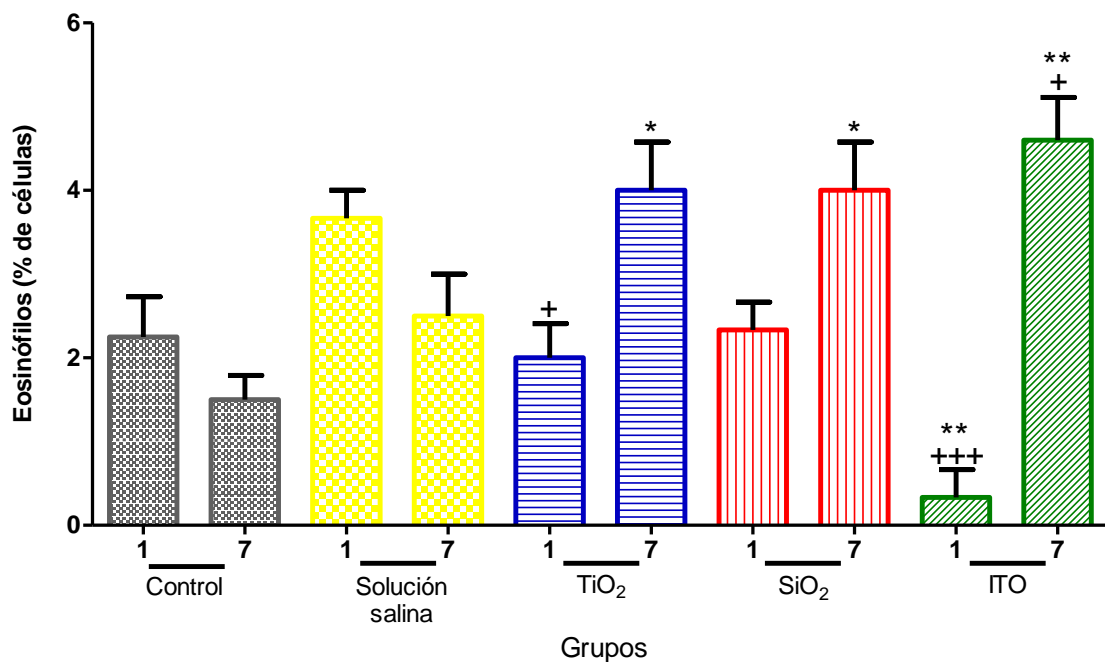


Figura 13. Porcentaje de células contadas en frotis de sangre. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar, n=3-5 de dos experimentos independientes. Parámetros medidos a 1 y a 7 días después de la administración de 2.5 mg/kg de nanopartículas. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 vs solución salina.

Para el porcentaje de basófilos se obtuvo que en el grupo de TiO₂ NPs aumentó 4 veces (barras azules; **p<0.01 vs control) y 4.8 veces después de un día contra (barras azules; +p<0.05 vs solución salina). En el caso del grupo de ITO NPs aumentaron 2.2 veces (barras verdes; ***p<0.001 vs control) y 2.7 veces después de un día (barras verdes; ++p<0.01 vs solución salina) (Figura 14).

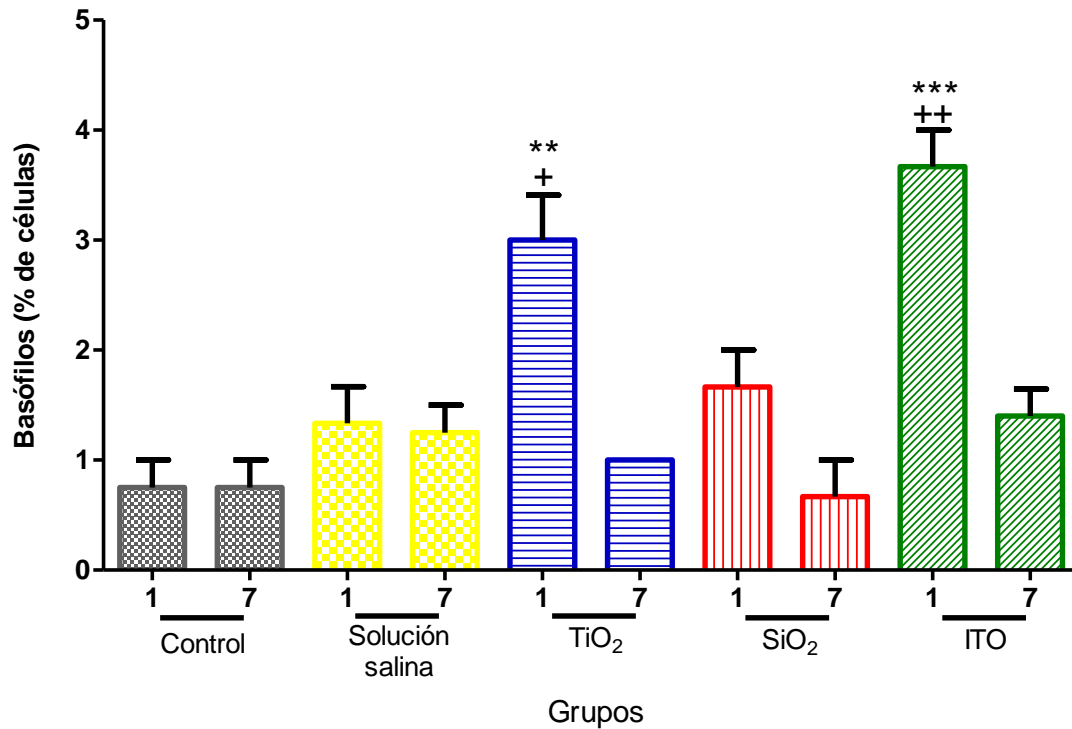


Figura 14. Porcentaje de células contadas en frotis de sangre. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar, n=3-5 de dos experimentos independientes. Parámetros medidos a 1 y a 7 días después de la administración de 2.5 mg/kg de nanopartículas. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 vs solución salina.

En el conteo de linfocitos el grupo de TiO₂ NPs disminuye un 8% (barras azules; *p<0.05 vs control) y un 13% después de un día (barras azules; **p<0.01 vs solución salina), pero aumenta un 13% (barras azules; ***p<0.001 vs control) y un 9% después de 7 días (barras azules; *p<0.05 vs solución salina). Para el grupo SiO₂ NPs solamente disminuye 10% después de un día (barras rojas; *p<0.05 vs solución salina). En los grupos de ITO NPs de igual manera disminuyen un 11% (barras verdes; **p<0.01 vs control) y un 15% después de un día (barras verdes; **p<0.01 vs solución salina), sin embargo aumenta el 14% (barras verdes; ***p<0.001 vs control) y 10% a los 7 días (barras verdes; **p<0.01 vs solución salina) (Figura 15).

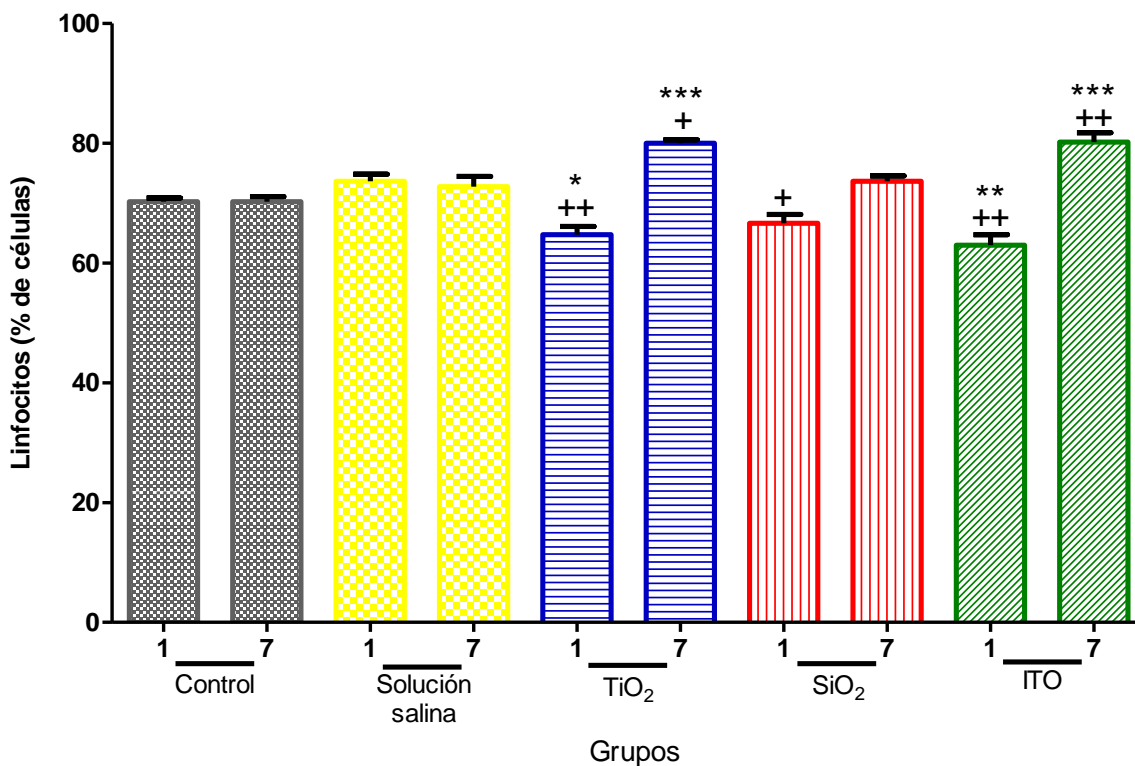


Figura 15. Porcentaje de células contadas en frotis de sangre. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar, n=3-5 de dos experimentos independientes. Parámetros medidos a 1 y a 7 días después de la administración de 2.5 mg/kg de nanopartículas. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs solución salina.

Para los monocitos solamente se observa un incremento en el grupo ITO NPs de 2.2 veces (barras verdes; **p<0.01 vs control) y de 1.9 veces después de un día (barras verdes; +p<.05 vs solución salina) (Figura 16).

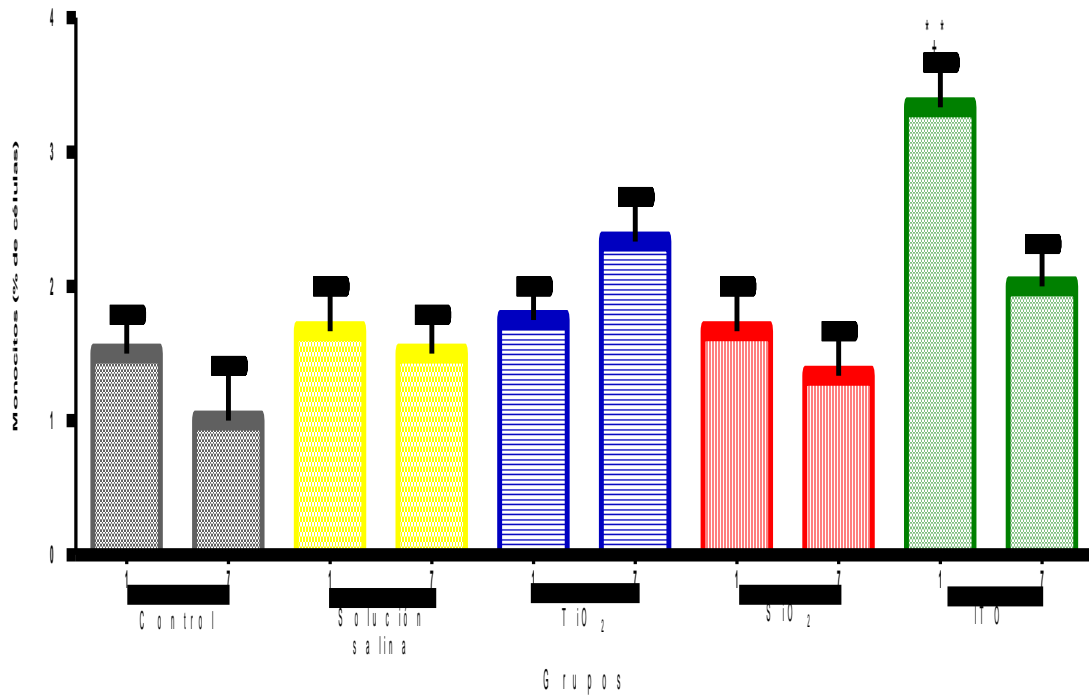


Figura 16. Porcentaje de células contadas en frotis de sangre. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar, n=3-5 de dos experimentos independientes. Parámetros medidos a 1 y a 7 días después de la administración de 2.5 mg/kg de nanopartículas. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 vs solución salina.

8.4 Viabilidad celular en cultivos primarios

La viabilidad celular obtenida con el cultivo primario de hígado expuesto NPs se detalla de la siguiente manera: Primero se muestra la exposición *in vitro* de NPs en donde sólo se expuso el cultivo primario con TiO₂, SiO₂ e ITO NPs (barras azules) y en dichos porcentajes los grupos administrados con NPs se observa que la viabilidad celular disminuye en un 65% (**p<0.001 vs control), 61% (**p<0.001 vs control) y 68% (**p<0.001 vs control) respectivamente. Después se realizó el cultivo primario de los animales que a los que sólo se les administró de manera I.V. las NPs (barras amarillas) donde provocaron una disminución en la viabilidad celular del 67% (**p<0.001 vs control), 53% (**p<0.01 vs control) y 64% (**p<0.001 vs control), con TiO₂, SiO₂ e ITO NPs respectivamente. Finalmente, se usaron ambos métodos de exposición (tanto la administración I.V. en los animales como la exposición ya en el cultivo primario) (barras rosas). En este caso la viabilidad celular de los cultivos de los grupos administrados con TiO₂ e ITO NPs solamente disminuyeron 33% (*p<0.05 vs control) y 55% (**p<0.01 vs control), respectivamente (Figura 17).

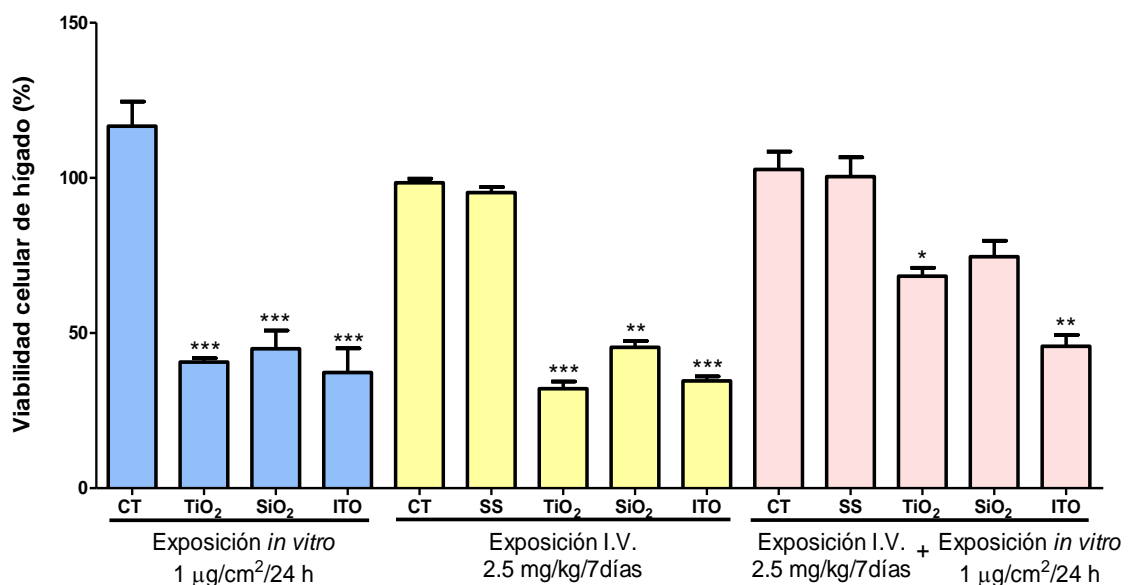


Figura 17. Porcentaje de viabilidad celular en cultivos primarios de hígado obtenidos de modelos *in vivo* e *in vitro*. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control.

La viabilidad celular obtenida con el cultivo primario de bazo expuesto NPs se detalla de la siguiente manera: Primero se muestra la exposición *in vitro* de NPs en donde sólo se expuso el cultivo primario con TiO₂, SiO₂ e ITO NPs (barras azules) y en dichos porcentajes los grupos administrados con NPs se observa que la viabilidad celular disminuye en un 78% (**p<0.01 vs control), 70% (**p<0.01 vs control) y 78% (**p<0.01 vs control) respectivamente. Después se realizó el cultivo primario de los animales que a los que sólo se les administró de manera I.V. las NPs (barras amarillas) donde provocaron una disminución en la viabilidad celular del 70% (**p<0.01 vs control), 62% (**p<0.01 vs control) y 80% (**p<0.01 vs control), con TiO₂, SiO₂ e ITO NPs respectivamente. Finalmente, se usaron ambos métodos de exposición (tanto la administración I.V. en los animales como la exposición ya en el cultivo primario) (barras rosas). En este caso la viabilidad celular de los cultivos de los grupos administrados con TiO₂ e ITO NPs solamente disminuyeron 33% (*p<0.05 vs control) y 55% (**p<0.01 vs control), respectivamente (Figura 18).

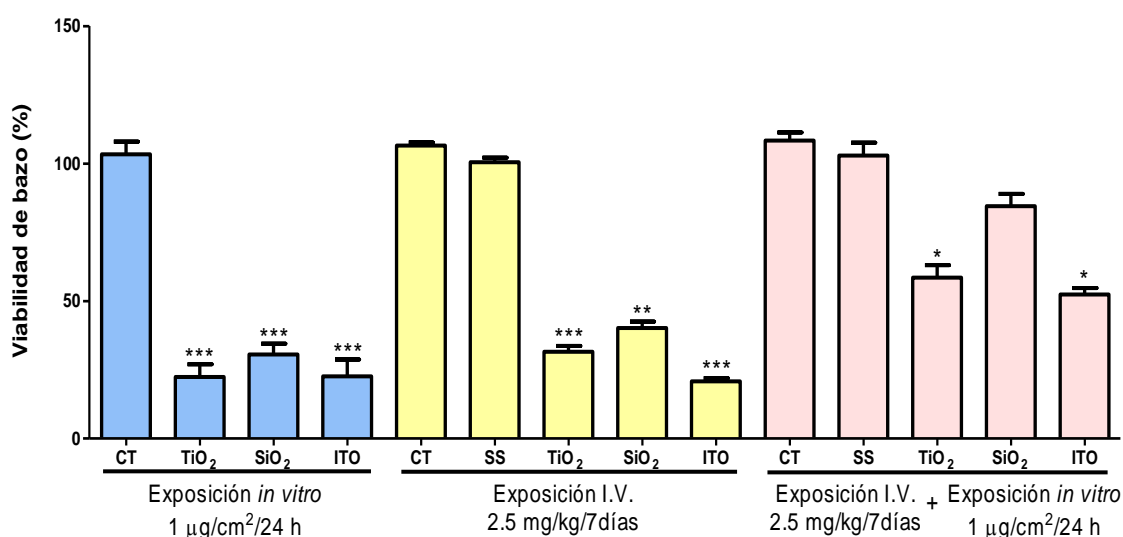


Figura 18. Porcentaje de viabilidad celular en cultivos primarios de bazo obtenidos de modelos *in vivo* e *in vitro*. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control.

9. DISCUSIÓN

Para analizar la toxicidad de las TiO_2 , SiO_2 , e ITO NPs se realizó una administración I.V. de 2.5 mg/kg_{BW} usando como vehículo solución salina y se midieron los parámetros hematológicos después de 1 y 7 días de la administración. La importancia de administrar las NPs intravenosamente es que independientemente de la vía de exposición a la que podamos estar expuestos a NPs, todas llegan al torrente sanguíneo, por eso con la administración I.V. se aprecian de mejor manera los efectos de las NPs al interactuar con los diferentes componentes que se encuentran en la sangre.

La caracterización de las NPs es de gran relevancia porque de este modo se observa y analiza las diferentes propiedades de las NPs. De estas propiedades dependen los efectos que las NPs provocan, un ejemplo es la biodistribución de las mismas. En la caracterización de TiO_2 NPs se obtuvo que presentan forma de banda, tamaño hidrodinámico de 258.4 ± 4.7 nm, índice de polidispersión de 0.9 y potencial z de -3.9. En las SiO_2 NPs se obtuvo que presentan forma esférica, su tamaño hidrodinámico de 499.1 ± 38.1 nm, un índice de polidispersión de 0.8 y con potencial z de -6.2. Para el caso de ITO NPs que presentan una morfología amorfa se obtuvo un tamaño hidrodinámico de 316 ± 41.8 nm, un índice de polidispersión de 0.9 y un potencial z de -12.5. En la bibliografía de trabajos anteriores no se encontraron datos donde emplearan dichas NPs con características similares y evaluaran sus efectos en parámetros hematológicos. Solamente en el caso de SiO_2 NPs Wai *et al.*, en 2017 usando las NPs con morfología de esférica evaluaron los efectos de las mismas en parámetros hematológicos. Hasta el momento no se han reportado trabajos donde evalúen los efectos de los aglomerados de las TiO_2 , SiO_2 , e ITO NPs suspendidas en

solución salina en el torrente sanguíneo, pero si se han reportado trabajos que emplean otros vehículos como agua desionizada, HPMC entre otros solventes (Hong *et al.*, en 2017; Sang *et al.*, 2011) y se observan efectos similares a lo reportado en esta tesis.

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (por sus siglas en inglés OECD) en su monográfico (no.116) recomienda el uso de Ratas Wistar para biocinética cuando se administra un agente vía I.V. (OECD, 2010).

Kreyling *et al.*, 2017 (Parte 1, 2, 3) evaluaron el porcentaje de retención en diferentes tejidos expuestos por diferentes vías a TiO₂ NPs suspendidas en solución acuosa en ratas Wistar a 1, 4 y 24 h y a 7 y 8 días. Kreyling *et al.*, 2017 (Parte 1) evaluaron de manera I.V. con una dosis de 40 y 400 µg/kg, donde observaron que en hígado se acumuló el 94.6 % ID (porcentaje de dosis inyectada) a 24 h y el 92.5 % ID a 7 días. En bazo se acumuló el 2.2 % ID a 24 h y el 2.7 % ID a 7 días. En sangre solamente se observó el 0.3 % ID a 24 h y el 0.04 % ID a 7 días. Kreyling *et al.*, 2017 (Parte 2) evaluaron de manera intraesofágica con una dosis de 30 y 80 µg/kg, donde observaron que en hígado se acumuló el 0.02 % ID a 24 h y el 0.007 % ID a 7 días. En bazo se acumuló el 0.004 % ID a 24 h y el 0.0016 % ID a 7 días. En sangre solamente se observó el 0.02 % ID a 24 h y el 0.001 % ID a 7 días. Kreyling *et al.*, 2017 (Parte 3) evaluaron de manera intratraqueal con una dosis de 40 y 240 µg/kg, donde observaron que en pulmones se acumuló el 96.8 % ID a 24 h y el 64.6 % ID a 7 días. En hígado se acumuló el 0.16 % ID a 24 h y el 0.11 % ID a 7 días. En bazo se acumuló el 0.010 % ID a 24 h y el 0.014 % ID a 7 días. En sangre solamente se observó el 0.26 % ID a 24 h y el 0.037 % ID a 7 días. En los estudios mencionados anteriormente, el paso de las TiO₂ NPs por el torrente sanguíneo es muy rápido

y por eso es muy pequeña la cantidad de NPs que se acumulan en el mismo. En los estudios de Kreyling *et al.* (Parte 1, 2, 3) cualquiera de las 3 vías que emplearon (I.V., intratraqueal e intraesofágica) corroboran lo antes mencionado, ya que la cantidad de Ti en sangre obtenida fue baja, específicamente 0.3% por vía I.V., 0.26% por vía intratraqueal y 0.02% vía intraesofágica y depende entre otros factores, de las vías de exposición para que lleguen a torrente sanguíneo y así distribuirse en diferentes tejidos (Figura 4).

El vehículo empleado fue solución salina isotónica al 0.9%, ya que dicha presenta la misma osmolaridad que el contenido de agua en la sangre y la misma concentración de sales requeridas en los eritrocitos. De esta manera no se produce una disminución o un aumento en el tamaño de los eritrocitos y es similar al medio en el que los mismos se encuentran en la sangre.

Los periodos de respuesta en la evaluación de este trabajo fueron después de 1 y 7 días de la administración I.V., dichos tiempos fueron elegidos para observar un efecto inmediato de la toxicidad en leucocitos provocado por las TiO₂, SiO₂ e ITO NPs y por el tiempo de vida que poseen las células como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos en el torrente sanguíneo. Aunque también hay que considerar el tiempo de vida de estas células a partir de una célula madre hematopoyética pluripotencial que se desarrolla en la médula ósea y hasta que se logra diferenciar al llegar al torrente sanguíneo (Janeway *et al.*, 2012).

En el hematocrito se observó que el porcentaje del paquete globular aumenta con la administración de SiO₂ NPs después de un día y disminuye en los grupos de SiO₂ e ITO después de 7 días (Figura 8). El impacto que tiene una disminución

en el hematocrito es que puede causar principalmente hemolisis (destrucción de glóbulos rojos) y anemia (Connes *et al.*, 2013).

En la concentración de hemoglobina se reportó una disminución en los grupos administrados con TiO₂ y SiO₂ después de 7 días y en ambos periodos para el grupo administrado con ITO NPs (Figura 9). Una disminución en la concentración de hemoglobina provoca hemorragias, deficiencia de hierro, anemia e inclusive linfomas. La disminución en los niveles de hematocrito y de hemoglobina provoca entre otras cosas, anemia (Johnson y Graham, 2011) y esto está fuertemente relacionado con lo reportado en este trabajo ya que se encontró una disminución en el peso de los animales (Tabla 4).

En el conteo total de leucocitos se observó un decremento en todos los grupos administrados con NPs en ambos periodos (Figura 10). Una disminución de leucocitos totales también conocida como leucopenia, tiene como consecuencia una gran susceptibilidad a diferentes patógenos (Luo ket al., 2009).

En el conteo diferencial de neutrófilos se observó un aumento en los 3 grupos administrados con NPs después de un día de administración, y después de 7 días decremantan pero solamente los grupos de TiO₂ e ITO NPs (Figura 11). El aumento de neutrófilos puede llevar a provocar enfermedades como la leucemia y la disminución de los mismos provocan anemia y ser susceptible a infecciones (Wright *et al.*, 2010).

En el conteo diferencial de eosinófilos se observó un decremento en los grupos de TiO₂ e ITO NPs después de un día de administración y después de 7 días un aumento en todos los grupos administrados con NPs (Figura 12). Los niveles altos de eosinófilos ocasionan inflamación en tejidos y niveles bajos ocasionan anemia, susceptibilidad a infecciones severas (Navabi y Upton, 2016).

En el conteo diferencial de basófilos solamente se observa un aumento en los grupos de TiO₂ e ITO NPs después de un día de administración (Figura 13). Un aumento en el número de basófilos de igual manera provoca anemia, enfermedades respiratorias e incluso leucemia (Siracusa *et al.*, 2013).

En el conteo diferencial de monocitos solamente hay un aumento en el grupo de ITO NPs después de un día de administración (Figura 15). El aumento de monocitos provoca el desarrollo de enfermedades autoinmunes e infecciones, tanto virales como bacterianas. Los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) junto con los monocitos son considerados como parte del sistema inmune innato, que es la primera barrera de defensa contra patógenos y su función principalmente es eliminar y fagocitar agentes patógenos (Dale *et al.*, 2008). Esto tendría sentido con lo reportado en este trabajo ya que para los neutrófilos, basófilos y monocitos aumentan al día y disminuyen a los 7 días. Curiosamente los eosinófilos aumentan hasta los 7 días, esto puede ser argumentado ya que en la activación de los mismos se liberan radicales libres y diversas proteínas tóxicas, dicho proceso puede llevar varios días lo que sugiere del por qué los eosinófilos se presentan sino hasta varios días después de la administración de NPs.

En el conteo diferencial de linfocitos se observa un decremento en los 3 grupos administrados después de un día de administración y un aumento después de 7 días en los grupos de TiO₂ e ITO NPs (Figura 14). El aumento de linfocitos es considerado como una reacción inmunitaria normal, pero sino es regulada correctamente puede llegar a provocar enfermedades como el cáncer (Ruffell *et al.*, 2010). Los linfocitos son células que son parte del sistema inmune adaptativo, que se adapta al reconocimiento del patógeno y es continuo después de la

activación de células pertenecientes al sistema inmune innato. Este reconocimiento específico permite dirigir mecanismos efectores y se caracteriza además por contar con un mecanismo de memoria y depende en una gran parte de las diferentes fases de la respuesta inmune con respecto al tiempo de inicio y duración de la respuesta (Tabla 5; Janeway *et al.*, 2012). Lo que concuerda con lo observado ya que el número de linfocitos aumenta hasta después de los 7 días de administración de NPs.

Tabla 5. Fases de la respuesta inmune con tiempo de inicio y duración.			
Respuesta		Tiempo típico después de la infección para iniciar la respuesta.	Duración de la respuesta
Respuesta inmune innata	Inflamación, activación del complemento, fagocitosis y destrucción de patógenos	Minutos	Días
Respuesta inmune adaptativa	Reconocimiento de antígeno, adhesión, co-estimulación, proliferación y diferenciación de linfocitos	Horas	Días
	Activación de linfocitos específicos de antígeno	Horas	Días
	Formación de linfocitos efectores y de memoria.	Días	Semanas
	Interacción de linfocitos, formación de centros germinales. Producción de anticuerpos	Días	Semanas
	Emigración de linfocitos efectores de órganos linfoides periféricos	Pocos días	Semanas
	Eliminación de patógenos por células efectoras y anticuerpos.	Pocos días	Semanas
Memoria inmunológica	Mantenimiento de linfocitos y niveles elevados de anticuerpos. Protección contra la reinfección.	Días a semanas	Puede ser para toda la vida

Lo anteriormente mencionado concuerda con lo reportado por Kumar *et al.*, en 2016 administraron 5, 25 y 50 mg/kg de TiO₂ NPs en forma anatasa de manera I.V. suspendidas en solución salina 1 vez a la semana durante 30 días en ratas Wistar. Las TiO₂-anatasa NPs se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM), DLS y analizador de potencial zeta. Las TiO₂ NPs fueron dispersadas en agua destilada y en buffer fosfato salino (PBS) y sonicadas durante 30 minutos. Con base en esto obtuvieron que las TiO₂ NPs presentaron una forma globular. Para el tamaño las TiO₂ NPs dispersadas en PBS tuvieron un promedio mayor (114.5±17.8 nm) que las dispersadas en agua destilada (72.3±9.5 nm). En el potencial zeta también fue más negativo en las TiO₂ NPs dispersadas en PBS (-24.2 ± 3.5 mV) que las TiO₂ NPs dispersadas en agua destilada (-11.6 ± 0.7 mV). En la evaluación de parámetros hematológicos Kumar *et al.* observaron que en la 1° y 2° semana el hematocrito, la hemoglobina y el conteo de eritrocitos disminuyeron con la dosis de 25 y 50 mg/kg pero después de la 3° semana vuelven al control. En el conteo de leucocitos totales estos aumentaron en todos los periodos con la dosis de 25 y 50 mg/kg. En el conteo de linfocitos aumentaron a partir de la 2° y 4° semana con la dosis de 5 mg/kg y en todos los periodos de con la dosis de 25 y 50 mg/kg. Para el conteo de neutrófilos aumentaron solamente en la 1° y 2° semana con la dosis de 5 y 25 mg/kg y en todos los periodos con la dosis de 50 mg/kg. Sin embargo cabe mencionar que las dosis usadas, especialmente 25 y 50 mg/kg son dosis altas difíciles de alcanzar por la vía I.V. Cabe mencionar que se encontraron resultados similares a los nuestros pero sólo se observaron alteraciones en dichos parámetros con las dosis más altas además de que administración de NPs fue por más tiempo.

De manera similar Hong *et al.*, en 2017 que administraron 1.25, 2.5 y 5 mg/kg de TiO₂ NPs de manera intragástrica diluidas en HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) en ratones ICR durante 9 meses, observaron un decremento en el número de leucocitos totales a partir de las dosis de 2.5 y 5 mg/kg y en los niveles de hemoglobina y eritrocitos en todas las dosis administradas. De forma similar Sang *et al.*, en 2011 administraron intragástricamente 2.5, 5 y 10 mg/kg de TiO₂ NPs suspendidas en HPMC en ratones ICR durante 90 días consecutivos y hallaron que la concentración de hemoglobina disminuye con las dosis de 5 y 10 mg/kg y el número de leucocitos totales, linfocitos y neutrófilos disminuyen en todas las dosis administradas. Esto fue argumentado demostrando que las NPs inducen procesos apoptóticos tanto en eritrocitos como en leucocitos y esto podría estar relacionado con generación de radicales libres y EO en la mitocondria provocado un cambio en la homeostasis celular.

En contraste con los resultados obtenidos Xu *et al.*, en 2013 administrando 140, 300, 300, 645 y 1387 mg/kg de TiO₂ NPs de manera I.V. suspendidas en solución salina en ratones ICR y evaluaron entre otras cosas los parámetros hematológicos 14 días después de la administración. No observaron cambios en hematocrito, hemoglobina ni en el conteo de eritrocitos pero sí observaron un aumento en el número de leucocitos totales con las dosis de 645 y 1387 mg/kg. También Wai *et al.*, en 2017 administraron de manera I.V. dosis de 1, 2.5, 5, 10, 100, 200 y 300 mg/kg de SiO₂ NPs suspendidas en solución salina en ratones BALB/c y evaluaron los parámetros hematológicos a 14 días después de la administración. No observaron cambios en el hematocrito, hemoglobina, conteo de eritrocitos, conteos de leucocitos totales, neutrófilos, basófilos ni eosinófilos. Solamente se observó un aumento en linfocitos y monocitos a los 14 días con la

dosis de 200 mg/kg. Esto se ha observado en otros estudios que reportan diferencias significativas en los niveles de diferentes poblaciones sanguíneas lo que nos lleva a pensar que es necesario aumentar el número de organismos por tratamiento ya que los diferentes fenotipos de los modelos experimentales pueden afectar la dispersión de los resultados e igualmente el uso de dosis consideradas excesivas (Disdier *et al.*, 2015; Elgrabli *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2016; Wai *et al.*, 2017 y Xu *et al.*, 2013). Es importante destacar que no se han encontrado estudios en donde se investigue toxicidad en los parámetros hematológicos de manera *in vivo* usando ITO NPs por ninguna vía de exposición. Aunque Abe *et al.*, en 2009 evaluaron la biodistribución de ITO NPs en ratones ICR administrando 0.16 mg/g vía I.V. usando solución salina como vehículo y observaron que las ITO NPs llegaron y se acumularon en pulmón, hígado y el bazo. Pero estas NPs disminuían al cabo de 4 semanas.

En el porcentaje de viabilidad celular de hígado y bazo se encontró que para ambos casos usando el cultivo con una exposición *in vitro* e I.V. la viabilidad disminuye empleando los 3 tipos de NPs e incluso de una manera muy parecida. Esto sirve como un modelo de predicción donde usando esas mismas dosis de NPs tienen un efecto parecido usando tanto en una exposición *in vivo* como una I.V. Pero al momento de combinar ambos métodos de exposición la viabilidad celular no disminuye tanto como en los métodos por separado. Esto sugiere un tipo de resistencia o adaptabilidad celular a la exposición repetida de NPs. La adaptación celular consiste en la respuesta que presentan las células ante estímulos fisiológicos excesivos, mediante la cual consiguen mantener un estado de equilibrio relativo que les permite preservar la viabilidad y función de la propia célula. Se sugiere que las células presentes en hígado y bazo hayan desarrollado

lo anteriormente mencionado al haber sido expuestas nuevamente a las NPs ya que ambos órganos respondieron de manera muy similar cuando fueron administrados con las NPs, principalmente con las TiO₂ e ITO NPs.

Existen muchos trabajos donde evalúan la biodistribución de TiO₂ NPs en diferentes tejidos administradas de manera I.V., intragástrica y usando una sonda (Cui *et al.*, en 2011; Disdier *et al.*, en 2015; Elgrabli *et al.*, en 2014; Fabian *et al.*, en 2008; Martins *et al.*, en 2017; Lee *et al.*, en 2016; Smulders *et al.*, en 2015) que corroboran que los órganos con mayor acumulación de TiO₂ NPs son principalmente hígado y bazo pero aún no se han hallado investigaciones en las que evalúen la viabilidad celular en los mismo ni si las SiO₂ e ITO NPs se acumulan de misma manera en dichos tejidos.

Por otro lado, existen varias explicaciones posibles sobre los efectos globales observados en esta tesis. Aunque hubo parámetros hematológicos que no fueron revisados en este trabajo como las plaquetas, células dendríticas, macrófagos, trombocitos, niveles de plasma entre otros, sí son importantes porque pudieran estar afectados de manera similar a la exposición de NPs.

A continuación sugiero algunas rutas de interacción entre NPs y las células del sistema inmune estudiadas aquí y que se esquematizan en la Figura 19.

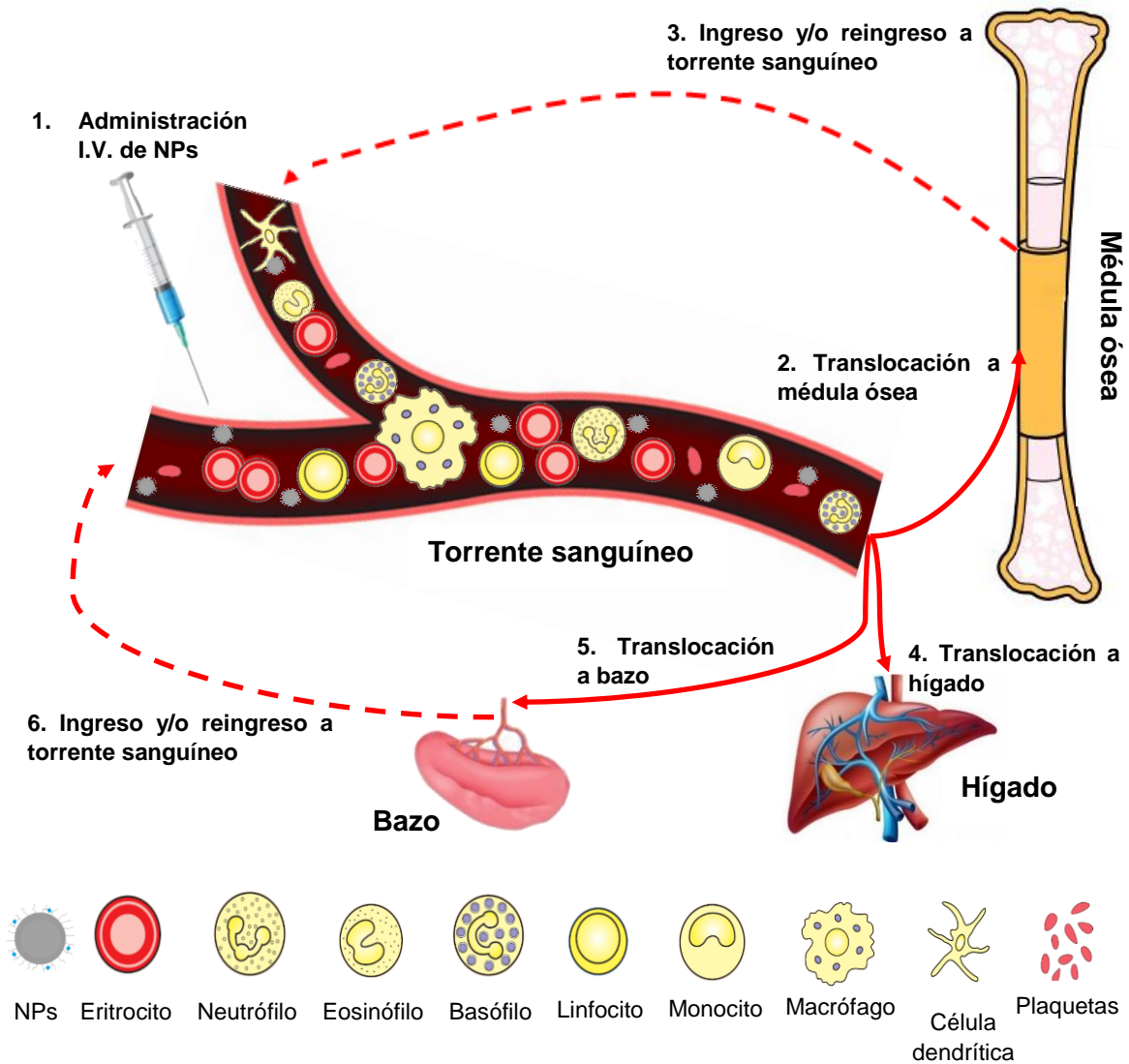


Figura 19. Rutas de interacción entre nanopartículas (NPs) y células sanguíneas

1. Exposición primaria de NPs a partir de la administración I.V.
2. NPs que van de torrente sanguíneo a médula ósea.
3. Ingreso de células afectadas en médula ósea por NPs al torrente sanguíneo o reingreso de células inmunes al torrente sanguíneo
4. NPs que van de torrente sanguíneo a hígado por medio de la vena porta.
5. NPs que van de torrente sanguíneo a bazo.
6. Ingreso de células afectadas en bazo por NPs al torrente sanguíneo o reingreso de células inmunes al torrente sanguíneo.

10. CONCLUSIONES

- El tamaño hidrodinámico más alto fue el de SiO₂ NPs, refiriéndose a que dichas NPs forman aglomerados más grandes al ser suspendidas en solución salina.
- Los índices de polidispersión más altos fueron de 0.9 en el caso de TiO₂ e ITO NPs.
- El potencial zeta más bajo fue el de ITO NPs con -12.5mV, indicando que dichas NPs son inestables al ser suspendidas en solución salina.
- La administración de TiO₂ no causó efectos sobre el paquete globular en ningún periodo sin embargo la administración de SiO₂ sí indujo un aumento al día y una disminución después de 7 días de administración, similar a lo que ocurrió con la administración de ITO NPs que causaron una disminución solamente después de 7 días.
- La concentración de hemoglobina disminuyó en los grupos administrados con TiO₂ y SiO₂ NPs solamente después de 7 días en comparación con el grupo administrado con ITO que disminuyó en ambos periodos.
- Todas las NPs estudiadas indujeron leucopenia en ambos tiempos evaluados. Además todas las NPs causaron neutrofilia después de 1 día de administración sin embargo, después de 7 días causaron neutropenia.
- Todas las NPs estudiadas indujeron eosinofilia después de 7 días.
- Las TiO₂ e ITO NPs provocaron basofilia después de un día.
- Las TiO₂ e ITO NPs causaron linfopenia después de un día y linfofilia después de 7 días.
- Todos los tipos de NPs indujeron un decremento en el porcentaje de viabilidad celular de hígado y bazo con una exposición *in vitro* e I.V.

11. DIRECCIONES FUTURAS

- Evaluación crónica: Se necesitaría realizar una evaluación de los mismos parámetros revisados en este trabajo usando el mismo modelo pero en este caso sería administrando dosis reales administradas parcialmente por periodos más largos. Por ejemplo observar lo que provocan las NPs en el hematocrito en una exposición parcial durante 3 meses.
- Otras vías de exposición: Con base en este trabajo y usando el mismo modelo sería relevante usar otras vías de administración destacadas como la inhalatoria o la oral y comparar si se provocan efectos similares en los parámetros hematológicos.
- Dosis: Para el caso de las dosis dependería de los tiempos a evaluar ya que como se mencionó anteriormente, en trabajos pasados empleaban dosis muy altas para observar un efecto notable o para evaluar biodistribución de NPs. Pero en trabajos futuros se emplearán dosis en las que realmente sean viables y en las que se asemejen a la vida real.
- Otros tipos de NPs: emplear otro tipo de NPs que sean destacadas y en las que estemos propensos a estar expuestos. Por ejemplo el dióxido de zinc (ZnO) que son también de las más producidas en el mundo, o inclusive los nanotubos de carbono.
- Obtención de células de médula ósea, diferenciarlas para línea mieloide/linfoide y exponerlas a diferentes concentraciones de NPs para corroborar si afectan la diferenciación a nivel basal o si simplemente alteran la composición celular por toxicidad.

12. REFERENCIAS

- Abe S., T. Yonezawa, T. Akasaka, M. Uo, F. Uchida y F. Watari. 2009. *Observation of Biodistribution of Indium-Tin Oxide Nanoparticles in Mice*. NanoBiomedicine. 1(1): 70-74.
- Athinarayanan J., V. Periasamy, y M. Alsaif. 2014. *Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells*. Cell Biology and Toxicology. 30: 92.
- Ávalos A., A. Haza, D. Mateo, y P. Morales. 2013. *Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente*. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 7(2):18.
- Bailon N y J. Romero. 2016. *Genotoxicidad de los nanomateriales, grandes discrepancias y desafíos*. Revista de Toxicología. 33(1): 8-15.
- Chen Z., H. Meng, G. Xing, H. Yuan, F. Zhao, R. Liu, X. Chang, X. Gao, T. Wang, G. Jia, C. Ye, Z. Chai y Y. Zhao. 2008. *Age-related differences in pulmonary and cardiovascular responses to SiO₂ nanoparticle inhalation: nanotoxicity has susceptible population*. Environmental Science & Technology. 42 (23): 8985-92.
- Chernousova S. y M. Epple. 2013. *Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal*. Angewandte Chemie International Edition; 52: 1637.
- Connes P., Y. Lamarre, M. Hardy, N. Lemonne, X. Waltz, D. Mougénel, M. Mukisi, M. Lalanne, V. Tarer, B. Tressières, M. Etienne y M. Romana. 2013. *Decreased hematocrit-to-viscosity ratio and increased lactate*

- dehydrogenase level in patients with sickle cell anemia and recurrent leg ulcers.* PLOS ONE. 8 (11): e79680
- Coutiño E., Ávila L. y Arroyo O. 2017. *Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo.* Revista de Educación Bioquímica. 36(2):39-54.
 - Cui Y., H. Liu, M. Zhou, Y. Duan, N. Li, X. Gong, R. Hu, M. Hong y F. Hong. 2011. *Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO₂ nanoparticles.* Journal of Biomedical Materials Research Part A. 96(1):221-9.
 - Dale D., L. Boxer y W. Liles 2008. *The phagocytes: neutrophils and monocytes.* Blood. 112: 935-945.
 - Disdier C., J. Devoy, A. Cosnefroy, M. Chalansonnet, N. Herlin, E. Brun, A. Lund, y A. Mabondzo. 2015. *Tissue biodistribution of intravenously administrated titanium dioxide nanoparticles revealed blood-brain barrier clearance and brain inflammation in rat.* Particle and Fibre Toxicology. 4: 12-27.
 - Elgrabli D., R. Beaudouin, N. Jbilou, M. Floriani, A. Pery y F. Rogerieux. 2015. *Biodistribution and Clearance of TiO₂ Nanoparticles in Rats after Intravenous Injection.* PLoS ONE 10(4): 4-7.
 - European Commission. 2011. *Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial.* Official Journal of the European Union. 275/40.
 - EPA (Agencia de protección ambiental).2016. <https://www.epa.gov/expobox/exposureassessmenttoolschemicalclaseesnanomaterials> 04/04/2016.

- Fabian E., R. Landsiedel, M. Lan, K. Wiench, W. Wohlleben y B. Ravenzwaay. 2007. *Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats*. Archives of Toxicology. 82: 151-157.
- Falk G. 2012. *Sintering of Transparent Conductive Oxides: From Oxide Ceramic Powders to Advanced Optoelectronic Materials*. Sintering of Ceramics—New Emerging Techniques. IntechOpen: 587.
- Feng X, A. Chen, Y. Zhang, J. Wang, L. Shao, y L. Wei. 2015. *Central nervous system toxicity of metallic nanoparticles*. International Journal of Nanomedicine.10: 4321-40.
- Garduño-Balderas LG, Urrutia-Ortega IM, Medina-Reyes EI, Chirino YI. 2015. *Difficulties in establishing regulations for engineered nanomaterials and considerations for policy makers: avoiding an unbalance between benefits and risks*. Journal of Applied Toxicology. 35(10):1073–1085.
- Gálvez V y C. Tanarro. 2010. *Toxicología de las nanopartículas*. Seguridad y salud en el trabajo. 56: 6-12.
- Gehr P. 2018. *Interaction of nanoparticles with biological systems*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 15: (172) 395-399.
- Gutiérrez L., M. Hernández y L. Borchert. 2013. *Daños para la salud tras exposición laboral a nanopartículas*. Medicina y Seguridad del Trabajo; 59: (231) 278-282.
- Gutiérrez D., A. Jos, S. Pichardo, M. Puerto, E. Sánchez-Granados, A. Grilo y A. Cameán. 2009. *Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas*. Revista de Toxicología; 26 (2-3): 87-92.

- Halliwell B. y J. Gutteridge. 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Journal of Free Radicals in Biology & Medicine. Fifth Edition 1(5), 1–10.
- Handin R., E. Samuel, y T. Stossel. 2003. *Blood: Principles and Practice of Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins: 471, 523,1014.
- He X. y Hwang H. 2016. *Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment*. Journal of Food and Drug Analysis. 4:671-681.
- Henry M. y J. Thompson. 2005. *Cirugía Clínica*. Masson Elsevier. 294.
- Hong F., Y. Zhou, Y. Zhou y L. Wang. 2017. *Immunotoxic effects of thymus in mice following exposure to nanoparticulate TiO₂*. Environmental Toxicology. 32(10): 2234-2243.
- Indium Corporation. 2018. *Safety data sheet: Industrial Use - Indium Tin Oxide, In₂O₃ - SnO₂ (tin doped indium oxide) (mixture)*. Potential uses include: thin film coating. SDS-IB011: 3.
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). 2015. *Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales*. (INSHT) C/Torrelaguna, 73 – 28027 Madrid. 5
- Janeway C., K. Murphy, P. Travers y M. Walport. 2012. *Janeway's immunobiology*. New York: Garland Science. Eighth edition. 8-35.
- Johnson T. y D. Graham. 2011. *Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century*. Therapeutic Advances in Gastroenterology. 4(3): 177-84.
- Kaushansky K. 2010. *Williams hematology*. McGraw-Hill Medical. 8: 256.

- Kazuyuki O., N. Makiko, H. Miyuki y C. Tatsuya. 2011. *Indium lung—case reports and epidemiology*. International Archives of Occupational and Environmental Health 84 (5): 471.
- Khan I., S. Khalid e I. Khan. 2017. *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*. Arabian Journal of Chemistry. 20.
- Kolhe P., E. Misra, R. Kannan, S. Kannan y M. Lieh. 2003. *Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers*. International Journal of Pharmaceutics. 259 (1-2):143-60.
- Kreyling W., U. Holzwarth, N. Haberl, J. Kozempel, S. Hirn, A. Wenk, C. Schleh, M. Schäffler, J. Lipka, M. Semmler-Behnke y N. Gibson. 2017. *Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intravenous injection in rats: Part 1*. Nanotoxicology. 11(4): 434-442.
- Kreyling W., U. Holzwarth, N. Haberl, J. Kozempel, S. Hirn, A. Wenk, C. Schleh, M. Schäffler, J. Lipka, M. Semmler-Behnke y N. Gibson. 2017. *Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats: Part 2*. Nanotoxicology. 11(4):443-453.
- Kreyling W., U. Holzwarth, N. Haberl, J. Kozempel, S. Hirn, A. Wenk, C. Schleh, M. Schäffler, J. Lipka, M. Semmler-Behnke y N. Gibson. 2017. *Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intratracheal instillation in rats: Part 3*. Nanotoxicology. 11(4): 454-464.
- Kumar S., R. Meena y R. Paulraj. 2016. *Role of Macrophage (M1 and M2) in Titanium-Dioxide Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Inflammatory Response in Rat*. Applied biochemistry and biotechnology. 180(7): 1257-1275.

- Kyung R. y Hyeon K. 2013. *Oxidative DNA Damage from Nanoparticle Exposure and Its Application to Workers' Health: A Literature Review*. Safety and Health at Work. 4:177-186.
- Landsiedel R., E. Fabian, L. Ma-Hock, B. Van Ravenzwaay, W. Wohlleben, K. Wiench y F. Oesch. 2012. *Toxico-/biokinetics of nanomaterials*. Archives of Toxicology. 86(7): 1021-1060.
- Llinàs M. y Sánchez D. 2014. *Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina*. Afinidad LXXI. 565: 23.
- Lee J., M. Kim, J. Song, M. Jo, J. Yu, K. Kim, Y. Kim, J. Oh y S. Choi. 2017. *Biokinetics of food additive silica nanoparticles and their interactions with food components*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.150: 384-392.
- Luo J, L. Hsieh, M. Chang y K. Hsu. 2009. *Decreased white blood cell counts in semiconductor manufacturing workers in Taiwan*. Occupational & Environmental Medicine. 59 (1): 44-8.
- Luo Y., L. Chang y P. Lin. 2015. *Metal-based nanoparticles and the immune system: activation, inflammation and potential applications*. BioMed Research International.143720.
- Martins A., L. Azevedo, C. de Souza, M. Carneiro, V. Venancio, M. de Almeida, L. Antunes, R. de Carvalho, J. Rodrigues, A. Ogunjimi, J. Adeyemi y F. Barbosa. 2017. *Evaluation of distribution, redox parameters, and genotoxicity in Wistar rats co-exposed to silver and titanium dioxide nanoparticles*. Journal of Toxicology and Environmental Health. 80(19-21): 1156-1165.

- Medina-Reyes EI, Garcia-Viacobo D, Carrero-Martinez FA y Chirino YI. 2017. *Applications and Risks of Nanomaterials Used in Regenerative Medicine, Delivery Systems, Theranostics, and Therapy*. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems. 34(1): 35-61.
- Miyake T., S. Akbar, O. Yoshida, S. Chen, Y. Hiasa, B. Matsuura, M. Abe y M. Onji. 2010. *Impaired dendritic cell functions disrupt antigen-specific adaptive immune responses in mice with nonalcoholic fatty liver disease*. Journal of Gastroenterology. 45: 859-867.
- Mossman B., P. Borm, V. Castranova, D. Costa, K. Donaldson y S. Kleeberger. 2007. *Mechanisms of action of inhaled fibers, particles and nanoparticles in lung and cardiovascular diseases*. Particle and Fibre Toxicology. 30; 4:4.
- Muñoz N. 2011. *Alcohol: agente que determina la evolución de lesiones hepáticas*. Facultad de Biofarmacia. Universidad Católica de la Cuenca. Cuenca, Ecuador. 33.
- Murashov V., P. Schulte y J. Howard .2012. *Progression of Occupational Risk Management with Advances in Nanomaterials*. Journal of Occupational and Environmental Hygiene; 9: D12-D22.
- Musso A. 2014. *Eritrocitos y eritrocitopatías*. Hematología. 18 (2): 151-155.
- Navabi B. y J. Upton. 2016. *Primary immunodeficiencies associated with eosinophilia*. Allergy, Asthma & Clinical Immunology. 12:27.
- NIOSH. 2016. *Occupational exposure to Titanium dioxide*. National Institute for Occupation Safety and Health; 160.

- Nohynek G., J. Lademann, C. Ribaud y M. Roberts. 2007. *Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety*. *Critical Reviews in Toxicology* 37:251-277
- Oberdörster G. 2001 *Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles*. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 74:1-8.
- Oberdörster G, E. Oberdorster y J. Oberdorster. 2005. *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. *Environmental Health Perspectives*. 113: 823-839.
- OECD. 2010. *Draft guidance document n° 116 on the design and conduct of chronic toxicity and carcinogenicity studies, supporting tg 451, 452, 453 table of contents*. 7.
- OSHA. 2016. *Occupational health guideline for amorphous silica*. U.S. Department Labor. Occupational Safety and Health Administration: 1.
- Panariti A., M. Giuseppe y R. Ilaria. 2012. *The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions?* *Nanotechnology, Science and Applications*. 5: 88.
- Panas A., C. Marquardt, O. Nalcaci, H. Bockhorn, W. Baumann, H. Paur, S. Mühlhopt, S. Diabaté, C. Weiss. 2013. *Screening of different metal oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epithelial cells and macrophages*. *Nanotoxicology*; 7(3):259-73.
- Parveen, A., Rizvi, S. H. M., Sushma. Mahdi, F., Ahmad, I., Singh, P. y Mahdi, A. A. 2015. *Intranasal exposure to silica nanoparticles induce alterations in pro inflammatory environment of rat brain: Involvement of oxidative stress*. *Toxicology and Industrial Health*. 33 (2): 122.

- Pichat P. 2014. Are TiO₂ nanotubes worth using in photocatalytic purification of air and water? *Molecules* 19: 15075–15087.
- Ramakrishna D. y R. Pragna. 2011. *Nanoparticles: Is Toxicity a Concern?* Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 22 (4): 92–101.
- Rodríguez C. 2016. *Genotoxicidad inducida por la exposición a dióxido de titanio grado alimenticio (E171) en células de cáncer colorrectal.* Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tlalnepantla de Baz. 18-19.
- Ruffell B., D. DeNardo, N. Affara, L. Coussens. 2010. *Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity.* Cytokine & Growth Factor Reviews. 21(1):3-10.
- Ryman J., J. Riviere y N. Monteiro. 2006. *Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties.* Toxicological Sciences 91:159-165.
- Sang X, L. Zheng, Q. Sun, N. Li, Y. Cui, R. Hu, G. Gao, Z. Cheng , J. Cheng, S. Gui, H. Liu, Z. Zhang y F. Hong. 2011. *The chronic spleen injury of mice following long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles.* Journal of Biomedical Materials Research Part A. 100A:894–902.
- Seaton A., L. Tran, R. Aitken y K. Donaldson. 2010. *Nanoparticles, human health hazard and regulation.* Journal of The Royal Society Interface 7 (Suppl 1):S119–S129.
- Siracusa M., B. Kim, J. Spergel y D. Artis. 2013. *Basophils and allergic inflammation.* Allergy and Clinical Immunology. 132 (4): 789–788.

- Smulders S., A. Ketkar-Atre, K. Luyts, H. Vriens, S. Nobre, C. Rivard, K. Van Landuyt, S. Baken, E. Smolders, L. Golanski, M. Ghosh, J. Vanoirbeek, U. Himmelreich y P. Hoet. 2016. *Body distribution of SiO₂-Fe₃O₄ core-shell nanoparticles after intravenous injection and intratracheal instillation*. *Nanotoxicology*. 10(5): 567-74.
- Subbeniak S 2016. *Physical and Chemical Nature of Nanoparticles*. Springer International Publishing. 2: 15-27.
- Shinohara N., N. Danno, T. Ichinose, T. Sasaki, H. Fukui, K. Honda y M. Gamo. 2014. *Tissue distribution and clearance of intravenously administered titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles*. *Nanotoxicology*; 8 (2):138.
- Takenaka S., E. Karg, Roth, C, Schulz, H, Ziesenis, A, Heinzmann, U, Schramel, P y Heyder J. 2001. *Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats*. *Environmental Health Perspectives*. 4: 547.
- Tarantino G., A. Scalera y C. Finelli. 2013. *Liver-spleen axis: intersection between immunity, infections and metabolism*. *World Journal of Gastroenterology*. 19(23):3534-42.
- Tiwari A., M. Ashraf-Khorassani y L. Marr. 2016. *C60 fullerenes from combustion of common fuels*. *Science of Total Environment*; 547:254-260.
- Turgeon M. 2004. *Clinical Hematology: Theory and Procedures*. Lippincott Williams & Wilkins. 100-115.
- Wai C., L. Cheng, J. Chiau, S. Fsiat, C. Liang, M. Cheng, H. Lee, C. Yeung y S. Hou. 2017. *In vivo toxicologic study of larger silica nanoparticles in mice*. *International Journal of Nanomedicine*: 12.

- Wang L., K. Wang, S. Swadeshmukul, X. Zhao, L. Hilliard, J. Smith y W. Tan. 2006. *Watching silica nanoparticles glow in the biological world*. Analytical Chemistry. 78: 646.
- Warheit D., T. Webb, L. Reed y S. Frerichs. 2007. *Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties*. Toxicology 250:104.
- Weyrich A y Zimmerman, G. 2004. *Platelets: signaling cells inside the immune continuum*. Trends Immunology: 25: 489.
- Wright H., R. Moots, R. Bucknall y S. Edwards. 2010. *Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases*, Rheumatology. 49 (9): 1618–1631.
- Xu J., H. Shi, R. Magaye, Y. Hongsheng, L. Lazar, B. Zou, C. Yang, A. Wu y J. Zhao. 2013. *Acute Toxicity of Intravenously Administered Titanium dioxide nanoparticles in mice*. PLOS ONE 8(8): e70618