

Toxicidad de nanopartículas de óxido de zinc y óxido cobre en células del sistema excretor

Elizabeth Mavil-Guerrero^{1,2} y Karla Oyuky Juárez Moreno^{1,3}

ISSN IMPRESO 2954-4327. ISSN ELECTRÓNICO 2992-7277
<https://dx.doi.org/10.58713/rf.v1i1.6> Ciudad de México

Resumen

Esta revisión resume la literatura sobre la toxicidad en células epiteliales de mamíferos de las nanopartículas (NPs) de óxido de zinc (ZnO) y óxido de cobre (CuO) publicada entre 2013 y parte del 2021. Los efectos nanotoxicológicos de las NPs ZnO y NPs CuO en las células dependen de la composición química de la nanopartícula, de su tamaño, y también, de la estructura y función de las células. El aumento del uso de las NPs ZnO y NPs CuO en la industria farmacéutica, cosmética, ambiental y alimentaria, lo que promueve que los seres humanos y otros organismos se encuentren ante una exposición a las NPs indeseada o incidental silenciosa. Las NPs pueden llegar al sistema circulatorio por vía inhalatoria o por ingestión para posteriormente

ser excretadas por el hígado y riñón. La exposición aguda de las células epiteliales de hígado y riñón a las NPs produce estrés oxidante, daño mitocondrial, alteraciones en el ciclo celular y respuestas inflamatorias que conducen a las células a una muerte apoptótica.

Palabras clave:

Sistema excretor, nanotoxicología, nanopartículas

1 Departamento de Bionanotecnología, Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, Baja California 22860, México.

2 Posgrado en Nanociencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, Baja California 22860, México.

3 CONACYT Cátedras, Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, Baja California 22860, México.

*Autor de correspondencia: E-mail: kjuarez@fata.unam.mx ORCID: 0000-0002-6171-8601

La nanotecnología es la ciencia que se encarga del diseño, creación y manipulación a nivel nanométrico de materiales que tienen por lo menos una de sus dimensiones dentro de la escala 1-100 nm (1). Estos nanomateriales pueden ser partículas, fibras o tubos y su origen puede ser natural, incidental o manufacturado. Se pueden encontrar en forma de partículas individuales, agregados o aglomerados (2). Los materiales a nanoescala tienen diferentes propiedades fisicoquímicas con base en su tamaño, forma, composición, química superficial y mayor área superficial de contacto, comparadas con la forma en el tamaño micro y macroscópico. Estas propiedades hacen que los nanomateriales sean interesantes para diferentes aplicaciones industriales y ambientales, pero al mismo tiempo, surge la preocupación de la exposición de los organismos vivos a estos nanomateriales con capacidad de reaccionar químicamente en los procesos biológicos (3). Es por ello, que la bionanotecnología y la nanotoxicología, estudian las aplicaciones y los efectos que los nanomateriales tienen en humanos, animales, bacterias, plantas, hongos u otros organismos vivos (1).

Recientemente, el estudio y la aplicación de los nanomateriales tiene relevancia en el área de la salud humana y animal, para desarrollar nuevas alternativas terapéuticas, de imagen y diagnóstico contra enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer (4). Uno de los más utilizados son las nanopartículas metálicas, como las de plata (Ag) y oro (Au); también, de óxidos metálicos como el óxido de cobre (CuO), óxido de zinc (ZnO) y dióxido de titanio (TiO₂) (5,6).

Las nanopartículas de ZnO y CuO pueden ingresar de manera natural al organismo por diferentes vías: oral, dérmica, inhalatoria o bien administradas por vía intravenosa, entre otras, con las que tienen

la capacidad de llegar a ser absorbidas por el sistema circulatorio y distribuirse por todo el organismo, para finalmente ser metabolizadas en el hígado y excretadas a través del riñón e hígado (Figura 2) en forma de fluidos como la orina y las heces fecales (7,8). Esto implica, que el hígado y el riñón realicen un trabajo arduo para excretar a las nanopartículas y con esto evitar su acumulación.



Figura 2. Principales vías de exposición a las nanopartículas y su transporte hacia el hígado y riñón. Creada por las autoras en biorender.com.

La exposición de los organismos a las NPs de ZnO y CuO ha provocado efectos no deseados en el hígado y riñón que van desde la acumulación o lesión hasta la muerte de células epiteliales que los componen, con exposiciones cortas de 24 horas evaluadas *in vitro* y de meses estudiadas en modelos animales para la experimentación (7,9). Algunos de los efectos nanotoxicológicos generados en células por evaluación *in vitro* son: reducción en la viabilidad celular, daños en la membrana celular, generación de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS, por sus siglas en inglés) e inflamación. Por otro lado, en modelos animales se han descrito efectos como la activación del sistema inmunitario

por medio de inflamación y de procesos alérgicos. También se ha reportado genotoxicidad por daños cromosómicos y en el ácido desoxirribonucleico (ADN), mutagenotoxicidad, efectos carcinógenos y estrés oxidativo, principalmente. Estas complicaciones pueden ser ocasionadas por la internalización de las nanopartículas, los iones liberados o únicamente por la interacción indirecta de las células con las nanopartículas (7,8,10).

Es importante mencionar, que la legislación sanitaria sobre los nanomateriales en México es escasa. No existe una norma oficial mexicana (NOM) para la fabricación de productos y materias primas de nanomateriales y mucho menos para su uso en la industria farmacéutica, alimentaria, ambiental y cosmética. Esta desregulación sanitaria permea el diseño y la fabricación heterogénea de estos nanomateriales, lote a lote, y no garantiza la calidad de los productos en los lotes subsecuentes.

Por lo anterior, en este trabajo se resumen los efectos nanotoxicológicos reportados por la exposición aguda a nanopartículas de ZnO y CuO en células epiteliales de hígado y riñón al estar expuestas a diferentes concentraciones de estas nanopartículas.

Métodos

Se realizó una búsqueda automatizada en la base de datos internacional PubMed (nih.gov) y en la revista de la Gaceta UNAM, empleando las palabras clave: *NPs ZnO*, *NPs CuO*, *células epiteliales de riñón e hígado* para artículos originales y de revisión. Los criterios para la selección de los artículos fueron la fecha de publicación con un máximo de antigüedad de 8 años y su impacto en la nanotoxicología. Para la sección de efectos nanotoxicológicos ocasionados por nanopartículas de óxido

de cobre, se decidió incluir artículos originales en otras células que componen al ser humano, ya que se encontraron escasos estudios en células de hígado y riñón.

Uso de las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de cobre por las diferentes industrias

Industria Ambiental

En cuanto al uso ambiental se resalta la formulación de biocidas y pesticidas con la finalidad de detener el crecimiento de ciertos organismos que causan enfermedades en cultivos, áreas forestales o acuáticas. Esto implica la exposición a estas nanopartículas por bacterias, hongos, crustáceos, algas, peces, entre otros, que son hospederos naturales y necesarios para el equilibrio de la vida.

Asimismo, Bondarenko et al. (5), estudiaron los efectos tóxicos de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos, determinaron que las NPsZnO y NPsCuO con tamaños de 20-150 nm son las más tóxicas a concentraciones de 2-3 mg/L de agua, en crustáceos, algas, peces, levaduras, y de 100 mg/L para bacterias, nematodos y protozoos. También, concluyeron que las algas son el organismo más afectado, siendo relevante por ser el alimento de diversos peces.

Industria Biomédica

Las aplicaciones de las nanopartículas de ZnO y CuO en el área biomédica, es debido a que su tamaño nanométrico facilita su internalización en las células. Se utilizan en la administración concomitante con fármacos y para diagnóstico mediante estudios de bioimagen. También, se les atribuyen a las NPs ZnO efectos anticancerígenos, anti-diabéticos, antibacterianos, antioxidantes, antiinflamatorios. En una revisión realizada por Mishra et al. (11) y Jiang et al. (12) re-

sumen que las NPs ZnO tienen efectos anticancerígenos en órganos como el pulmón, ovarios, cérvix, estómago, en cáncer de células humanas epidermales y en la leucemia promielocítica aguda. De acuerdo con Tang (13) las NPs ZnO obtenidas por síntesis verde mostraron una reducción significativa del colesterol en un modelo de ratas diabéticas administrando a una dosis de 1–10 mg/kg por 56 días. Estos resultados sugieren que las NPs ZnO se podrían utilizar como terapia farmacológica en la diabetes *mellitus*. Además, Jiang et al. (12) mencionan el efecto antidiabético de estas nanopartículas con tamaños de 10 a 95 nm, las cuales reducen la cantidad de glucosa en sangre y colesterol.

Por otro lado, las nanopartículas de CuO han sido estudiadas por sus propiedades anticancerígenas; por ejemplo, Rodhe et al. (14) demostraron el efecto tóxico de las NPs CuO con un tamaño de 15 a 100 nm en células de leucemia. Concluyeron que estas NPs inducen un daño en el ADN de las células, la sobreproducción de ROS como los superóxidos, el peróxido de hidrógeno, el hidroxilo y otro tipo de radicales libres oxidantes que pueden dañar moléculas como lípidos, proteínas y alterar el sistema antioxidante que es regulado por la enzima superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa y también por el glutatión; finalmente ocasionan la muerte de la célula. Otra investigación relevante sobre las aplicaciones biológicas de las NPs CuO es la descrita por el grupo de Li *et al.* (15), quienes proponen un método altamente sensible y selectivo para la detección del virus de la gripe H1N1 que se basa en el marcaje de anticuerpos policlonales utilizando NPs CuO para detectar y unirse a los antígenos del virus H1N1. Y de forma más reciente en México, investigadores de la UNAM, han desarrollado un cubrebocas (SakCu) de nanocapas entre 30-40 nm de espesor

compuestas por una mezcla de plata y cobre que tiene efectividad para inactivar al SARS-CoV-2 e inhibir la proliferación de bacterias (16), este cubrebocas recientemente desarrollado estará a la venta para su uso, sin que se haya realizado una evaluación de los efectos secundarios a largo plazo causados por la posible liberación de las nanopartículas y sus efectos en células del sistema respiratorio e inmunológico.

Industria Cosmética

La industria cosmética emplea diferentes tipos de nanopartículas de óxidos metálicos y especialmente NPs ZnO y NPs CuO para la fabricación de cremas, protectores solares, maquillajes, cremas depilatorias, entre otros productos de belleza, que están en contacto directo con el órgano más grande del ser humano, la piel.

Dykes (17), realizó un estudio con la finalidad de probar el efecto de NPs CuO sobre la piel de mujeres, quienes utilizaron fundas de almohada y ropa de cama que contenían NPs CuO y el resultado fue que revelaron un aspecto mejorado en la piel del rostro, además de un aumento de la elasticidad en la piel del pie utilizando calcetines impregnados con NPs CuO. Además, las NPs ZnO están presentes en productos de belleza como polvo de maquillaje, corrector de ojeras e imperfecciones faciales, protector solar, bálsamo para imperfecciones, sombra de ojos, crema de protección solar, entre otros, en concentraciones que van de los 0.5-17 g/100g de producto, por lo que se requiere más investigación sobre los efectos tóxicos de este tipo de NPs en concentraciones superiores a los 17g/100 g de producto debido a la toxicidad sinérgica que podría resultar con el uso de más de un cosmético a la vez (18).

Industria Alimentaria

La industria alimentaria ha implementado el uso de las nanopartículas de óxidos metálicos y especialmente las de ZnO y CuO en la composición de envases primarios y secundarios para alimentos o bebidas, o bien, como excipientes dentro de la formulación de estos, lo que favorece el contacto con el producto alimenticio que es ingerido por el consumidor (5,19). También emplea a estas NPs como aditivos en los alimentos, por sus propiedades antimicrobianas reportadas en distintos estudios que demuestran la capacidad de las NPs ZnO con tamaño entre 30-100 nm para inducir la muerte por sobreproducción de ROS, principalmente en bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa* (12,20).

Excreción de las nanopartículas por el hígado y el riñón

El proceso farmacocinético al que son sometidas las nanopartículas al igual que los fármacos se divide en liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción, también llamado sistema LADME. Los órganos principales encargados de la excreción de los nanomateriales una vez que son metabolizados y biotransformados en moléculas o subproductos de menor tamaño son el hígado y el riñón. El hígado está conformado en un 60-80% por células epiteliales especializadas, llamadas hepatocitos, es capaz de excretar NPs con un radio hidrodinámico entre 50-200 nm por medio de las heces; mientras que el riñón está integrado por un 90% de células epiteliales y se encarga de la excreción de NPs con tamaño entre 6-15 nm es mediante la orina (21).

Diferentes estudios han demostrado que la excreción de la NPs por el hígado y el riñón tienen efectos tóxicos que afectan a las células de estos órganos, tales como espacios intersticiales, vacuolas, degradación y necrosis de las células epiteliales, procesos inflamatorios, daño al ADN y mitocondrias, sobreproducción de ROS, entre otras (7,9,22).

Además del tamaño, otro aspecto a considerar sobre la excreción de las NPs es su estabilidad para permanecer en fluidos como la sangre, ya que, si tienden a aglomerarse o agregarse, generan cambios en sus propiedades fisicoquímicas que juegan un papel perjudicial en la cinética de excreción, situación que es común cuando las NPs se administran por vía intravenosa. Además, debido a su química superficial, algunas NPs tienen la capacidad de formar una corona proteica, que es una estructura en la superficie de la NP que se construye al interactuar con las proteínas que se encuentran en el medio. Esto puede afectar los diversos parámetros fisicoquímicos de una NP, incrementando su tamaño y, por lo tanto, ocasionando que no pueda ser excretada por el hígado o el riñón y originando su acumulación (23).

Efectos nanotoxicológicos de las nanopartículas de óxido zinc y las nanopartículas de óxido de cobre en células del sistema excretor

En los apartados anteriores se mencionó que las NPs ZnO y NPs CuO tienen diferentes efectos tóxicos en las células lo que ocasiona una reducción de su viabilidad que culmina con la muerte de la célula (Figura 2). En este apartado, se presentan los efectos nanotoxicológicos descubiertos hasta ahora en células que constituyen el hígado y el riñón, para lo cual se muestran las tablas 1 y 2 que resumen los efectos tóxicos estudiados.



Figura 2. Resumen gráfico que representa la toxicidad y aplicaciones que tienen las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de cobre en células epiteliales de hígado y riñón. Creada por las autoras en biorender.com.

LÍNEA CELULAR	TAMAÑO DE NPS (NM)	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN	EFECTO TÓXICO	REFERENCIA
Células de riñón embrionarias HEK 293	25–40 nm	3, 24 y 48 h	5, 25, 50 y 75 µg /mL	Muerte apoptótica por incremento de ROS y pérdida del potencial de la membrana mitocondrial	(24)
HEK293	36 nm	0- 5 h	0.1, 1, 10, y 100 µg/mL	Daño al ADN por incremento de micronúcleos	(25)
Células epiteliales de riñón NRK-52E	10-50 nm	24 h	12.5–50.0 µg/mL	Reducción de la viabilidad celular por daño al ADN	(26)

LÍNEA CELULAR	TAMAÑO DE NPS (NM)	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN	EFECTO TÓXICO	REFERENCIA
Células de riñón MDCK	100 nm	24 h	12-737 μ M	Muerte celular por genotoxicidad y disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes	(27)
HepG2 y HK-2	100 nm	24 h	256 μ g/mL	Reducción de la viabilidad por daño al ciclo celular	(28)
Línea celular hepatocito C3A	130 nm	24 h	0.5–256 mg/mL	Citotoxicidad en las células con aumento claro de la producción de IL-8	(29)

Tabla 1. Efectos tóxicos de las NPsZnO reportados en diferentes estudios in vitro en células de hígado y riñón.

Las investigaciones resumidas en la *Tabla 1*, demuestran que los diferentes efectos tóxicos ocasionados por las NPs ZnO desencadenan la muerte de las células, pero no proponen un mecanismo biológico/molecular detallado que permita conocer con exactitud mayor lo que las NPs causan en las células. Sin embargo, Zhang et al. (30), proponen un mecanismo de muerte inducida por alteración en las enzimas del sistema antioxidante generado por disminución de los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) para el péptido glutatión y la enzima glutatión peroxidasa, ambas moléculas importantes del sistema antioxidante celular, además del aumento en el malondialdehído. Los autores demuestran que existe un daño en el

potencial de la mitocondria por acumulación de hierro en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés) después de ser expuestas por 24 h a concentraciones de 10 y 15 μ g/ μ L de NPs ZnO con un tamaño de 30 ± 10 nm.

Para esto Zhang *et al.* (30), proponen un mecanismo de muerte celular por ferroptosis, que se induce por la acumulación de hierro y es dependiente de la peroxidación de lípidos. Aunque el trabajo descrito por Zhang *et al.* (30) se llevó a cabo en células HUVEC, es una investigación muy completa, que da pauta para realizar investigaciones similares, pero en células del sistema excretor con tamaños de NPs diferentes.

LÍNEA CELULAR	TAMAÑO DE NPS (NM)	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN	EFECTO TÓXICO	REFERENCIA
Células de riñón embrionarias HEK 293	<50 nm	48 h	3 mg/mL y 300 mg/mL	Daño a la membrana celular y estrés oxidante	(31)
Linfocitos	<100	2, 4 y 6 h	0.1, 0.2, 0.4, 0.5 y 0.8mM	Muerte celular por peroxidación de lípidos, daño a la mitocondria y a los lisosomas	(25)
Células de Kupffer y hepatocitos	114.4 y 362.1	5, 6 y 24 h	12.5, 25, 50, y 100 µg/mL	Muerte apoptótica y estrés mitocondrial	(33)
Células de glioma C6 y astrocitos	141±13	30 min y 5 h	10-1000 µM	Reducción de la viabilidad celular y de lactato deshidrogenasa (LDH).	(34)
Células humanas de epitelio alveolar A549	75 nm	24 h	0.32, 1.6, 3.2, 16.1, and 32.1 µg/cm ²	Promoción de la formación de un inflamasoma por aumento de IL-1a y actividad proinflamatoria por IL-6	(35)
Hemocitos y células gliales y alveolares	197 y 210	2, 4 y 24 h	0.05, 0.5, 2.75 and 5 mg/L	Muerte celular por estrés oxidante e inhibición de la Na-K-ATPasa y daño al ADN	(36)
HepG2 y Caco-2	221.53 nm	24 h	2.5, 5, 10,15, 20 y 40 µg/mL	Muerte celular apoptótica por daño al ADN	(37)

Tabla 2. Efectos tóxicos de las NPsCuO reportados en diferentes estudios in vitro en células de mamíferos.

La regulación sanitaria de los nanomateriales en México

El uso de las NPs para distintas aplicaciones aumenta continuamente, sin embargo, la legislación sanitaria en México esta rezagada. No existen normas oficiales mexicanas (NOMs), únicamente normas mexicanas, tales como la NMX-R-10867-SCFI-2014, para la caracterización de nanotubos de carbono de una capa mediante espectroscopia de fotoluminiscencia en el infrarrojo cercano; la norma NMX-R-10929-SCFI-2014, para la caracterización de muestras de nanotubos de carbono de múltiples capas; la NMX-R-27687-SCFI-2014, que plantea una terminología y definiciones para nano-objetos-nanopartícula, nanofibra y nanoplaca; la norma NMX-R-80004-1-SCFI-2014 nanotecnologías; el Vocabulario-Parte 1: Conceptos básicos; la norma NMX-R-80004-3-SCFI-2014, Nanotecnologías-Vocabulario-Parte 3: nano-objetos de carbono (38) y por último la NMX-R-12901-1-SCFI-2015 nanotecnologías-Gestión de riesgo ocupacional aplicado a nanomateriales manufacturados (39). Todas estas normas no son obligatorias sino voluntarias, flexibles y no reglamentarias, por lo que esta desregulación sanitaria conlleva a un flujo incontrolado de la producción y síntesis de NPs para diferentes aplicaciones a las que nos encontramos constantemente expuestos.

Además, los productos o materias primas que contienen NPs no se someten a pruebas de seguridad y eficacia establecidas en una norma oficiales mexicana, como es para el caso de productos ambientales, cosméticos, alimentarios y de insumos para la salud que contienen materias primas microscópicas y macroscópicas. Si bien, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

(COFEPRIS) realiza una evaluación por medio del comité de moléculas nuevas cuando un nanomaterial es propuesto con fines terapéuticos, es fundamental tomar medidas regulatorias obligatorias mediante normas oficiales mexicanas, que garanticen la calidad, seguridad y eficacia para su uso en humanos y animales en lotes subsecuentes de los nanomateriales en todas las áreas de aplicación.

Por lo anterior, es importante implementar Normas Oficiales Mexicanas (NOM), que son de carácter obligatorio y que contienen lineamientos que permiten obtener medidas uniformes y garantizar la calidad, seguridad y eficacia de los nanomateriales en productos o materias primas. Estas NOMs deben establecerse entre los legisladores, la comunidad académica y la industria privada para señalar pautas por un beneficio común sobre la seguridad de los productos o materias primas (40). La comunidad académica mexicana se ha organizado para impulsar esto, a través de la Red de Nanociencias y Nanotecnología (RNyN, CONACYT), la cual promovió la creación del Sistema Nacional de Evaluación Toxicológica (SINANOTOX), que es un grupo de investigadores provenientes de universidades públicas y privadas que conjuntan su experiencia en la Nanotoxicología para proponer protocolos estandarizados que permitan realizar pruebas toxicológicas de los nanomateriales y comparar sus efectos en diversos modelos biológicos. Los resultados que se obtienen permiten contribuir con evidencia científica a la regulación sanitaria de los nanomateriales y en la gestión de la implementación de las NOMs para garantizar su seguridad (39).

Conclusiones y comentarios

Los NPs de ZnO y CuO afectan las respuestas celulares *in vitro* de varios tipos de células epiteliales de hígado y riñón. La mayoría de los estudios sugieren que los efectos nanotoxicológicos más comunes son estrés oxidante, daño mitocondrial y alteraciones en los estadios del ciclo celular presuntamente causados por los iones Zn²⁺ y Cu²⁺ que resultan de la disolución de las NPs fuera de la célula, la internalización de las NPs o bien por combinación NP-ion. Los resultados de las evaluaciones toxicológicas *in vitro* indican que la inducción de estrés oxidante es el mecanismo más importante o probable que subyace a la toxicidad y conlleva a la célula a una muerte por apoptosis. Sin embargo, los efectos nanotoxicológicos que inducen la muerte de las células por la exposición a NPs ZnO y CuO durante su excreción por el hígado y el riñón siguen siendo una interrogante, sobre todo por el mecanismo intrínseco y sumamente relevante de las células que componen a estos dos órganos, y principalmente el de las células epiteliales. Ya que, los efectos tóxicos de las nanopartículas dependen de su tamaño y composición química, pero también de su interacción con la estructura y función celular que varía entre cada tejido. Finalmente, la regulación sanitaria en México requiere solicitar pruebas *in vitro* mediante una NOM que garanticen la seguridad en la salud humana y animal con el uso de productos que contengan nanomateriales.

Referencias

1. Chan WCW. Bionanotechnology progress and advances. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12(1).
2. Boverhof DR, Bramante CM, Butala JH, Clancy SF, Lafranconi M, West J, et al. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015 Oct;73(1).
3. Navya PN, Daima HK. Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives. *Nano Converg*. 2016;3(1).
4. Arora S, Rajwade JM, Paknikar KM. Nanotoxicology and *in vitro* studies: The need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;258(2).
5. Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells *in vitro*: a critical review. *Arch Toxicol*. 2013;87(7).
6. Shakeel M, Jabeen F, Shabbir S, Asghar MS, Khan MS, Chaudhry AS. Toxicity of nano-titanium dioxide (TiO₂-NP) through various routes of exposure: a review. *Biol Trace Elem Res*. 2016;172(1).
7. Chen A, Feng X, Sun T, Zhang Y, An S, Shao L. Evaluation of the effect of time on the distribution of zinc oxide nanoparticles in tissues of rats and mice: a systematic review. *IET Nanobiotechnology*. 2016;10(3).
8. Bugata LSP, Pitta Venkata P, Gundu AR, Mohammed Fazlur R, Reddy UA, Kumar JM, et al. Acute and subacute oral toxicity of copper oxide nanoparticles in female albino Wistar rats. *J Appl Toxicol*. 2019;39(5).

9. Hassanen EI, Tohamy A, Issa MY, Ibrahim MA, Farroh KY, Hassan AM. Pomegranate juice diminishes the mitochondria-dependent cell death and NF- κ B signaling pathway induced by copper oxide nanoparticles on liver and kidneys of rats. *Int J Nanomedicine*. 2019;14.
10. El Bialy BE, Hamouda RA, Abd Eldaim MA, El Ballal SS, Heikal HS, Khalifa HK, et al. Comparative toxicological effects of biologically and chemically synthesized copper oxide nanoparticles on mice. *Int J Nanomedicine*. 2021;15.
11. Mishra PK, Mishra H, Ekielski A, Talegaonkar S, Vaidya B. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug Discov Today*. 2017;22(12).
12. Jiang J, Pi J, Cai J. The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioinorg Chem Appl*. 2018;2018.
13. Tang KS. The current and future perspectives of zinc oxide nanoparticles in the treatment of diabetes mellitus. *Life Sci*. 2019;239.
14. Rodhe Y, Skoglund S, Odnevall Wallinder I, Potáková Z, Möller L. Copper-based nanoparticles induce high toxicity in leukemic HL60 cells. *Toxicol Vitr*. 2015;29(7).
15. Li Y, Hong M, Lin Y, Bin Q, Lin Z, Cai Z, et al. Highly sensitive electrochemical immunoassay for H1N1 influenza virus based on copper-mediated amplification. *Chem Commun*. 2012;48(52).
16. Fernando Guzmán. Hecho en CU: Cubrebocas antimicrobiano. *Gaceta UNAM* [Internet]. 2021;0188:1–6. Disponible en: <https://www.gaceta.unam.mx/hecho-en-cu-cubrebocas-antimicrobiano/>
17. Dykes P. Increase in skin surface elasticity in normal volunteer subjects following the use of copper oxide impregnated socks. *Ski Res Technol* [Internet]. 2015;21(3):272–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/srt.12187>
18. Kim K-B, Kim YW, Lim SK, Roh TH, Bang DY, Choi SM, et al. Risk assessment of zinc oxide, a cosmetic ingredient used as a UV filter of sunscreens. *J Toxicol Environ Heal Part B* [Internet]. 2017;20(3):155–82. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10937404.2017.1290516>
19. Liu Z, Wang C, Hou J, Wang P, Miao L, Lv B, et al. Aggregation, sedimentation, and dissolution of CuO and ZnO nanoparticles in five waters. *Environ Sci Pollut Res*. 2020;25(31).
20. Stankic S, Suman S, Haque F, Vidic J. Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties. *J Nanobiotechnology*. 2016;14(1).
21. Li M, Zou P, Tyner K, Lee S. Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of Pharmaceutical Nanoparticles. *AAPS J* [Internet]. 2017;19(1):26–42. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12248-016-0010-3>
22. Iavicoli I, Fontana L, Nordberg G. The effects of nanoparticles on the renal system. *Crit Rev Toxicol*. 2016;46(6).
23. Arami H, Khandhar A, Liggitt D, Krishnan KM. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2015;44(23).
24. V.G. R, P.V. M. Cellular interactions of zinc oxide nanoparticles with human embryonic kidney (HEK 293) cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2017;157.

25. Demir E, Creus A, Marcos R. Genotoxicity and DNA repair processes of zinc oxide nanoparticles. *J Toxicol Environ Heal Part A*. 2014;77(21).
26. Uzar NK, Abudayyak M, Akcay N, Algun G, Özhan G. Zinc oxide nanoparticles induced cyto- and genotoxicity in kidney epithelial cells. *Toxicol Mech Methods*. 2015;25(4).
27. Kononenko V, Repar N, Marušič N, Drašler B, Romih T, Hočevár S, et al. Comparative *in vitro* genotoxicity study of ZnO nanoparticles, ZnO macroparticles and ZnCl₂ to MDCK kidney cells: Size matters. *Toxicol Vitro*. 2017;40.
28. Thongkam W, Gerloff K, van Berlo D, Albrecht C, Schins RPF. Oxidant generation, DNA damage and cytotoxicity by a panel of engineered nanomaterials in three different human epithelial cell lines. *Mutagenesis*. 2017;32(1).
29. Kermanizadeh A, Vranic S, Boland S, Moreau K, Baeza-Squiban A, Gaiser BK, et al. An *in vitro* assessment of panel of engineered nanomaterials using a human renal cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory response, oxidative stress and genotoxicity. *BMC Nephrol*. 2013;14(1).
30. Zhang C, Liu Z, Zhang Y, Ma L, Song E, Song Y. "Iron free" zinc oxide nanoparticles with ion-leaking properties disrupt intracellular ROS and iron homeostasis to induce ferroptosis. *Cell Death Dis*. 2020;11(3).
31. Reddy ARN, Lonkala S. *In vitro* evaluation of copper oxide nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative stress using human embryonic kidney cells. *Toxicol Ind Health*. 2019;35(2).
32. Assadian E, Zarei MH, Gilani AG, Farshin M, Degampanah H, Pourahmad J. Toxicity of copper oxide (CuO) nanoparticles on human blood lymphocytes. *Biol Trace Elem Res*. 2018;184(2).
33. Wang X, Chang CH, Jiang J, Liu X, Li J, Liu Q, et al. Mechanistic differences in cell death responses to metal-based engineered nanomaterials in Kupffer cells and hepatocytes. *Small*. 2020;16(21).
34. Joshi A, Rastedt W, Faber K, Schultz AG, Bulcke F, Dringen R. Uptake and toxicity of copper oxide nanoparticles in C6 glioma cells. *Neurochem Res*. 2016;41(11).
35. Hufnagel M, Neuberger R, Wall J, Link M, Friesen A, Hartwig A. Impact of differentiated macrophage-like cells on the transcriptional toxicity profile of CuO nanoparticles in co-cultured lung epithelial cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9).
36. Katsumiti A, Thorley AJ, Arostegui I, Reip P, Valsami-Jones E, Tetley TD, et al. Cytotoxicity and cellular mechanisms of toxicity of CuO NPs in mussel cells *in vitro* and comparative sensitivity with human cells. *Toxicol Vitro*. 2018;48.
37. Abudayyak M, Guzel E, Özhan G. Cupric Oxide Nanoparticles Induce Cellular Toxicity in Liver and Intestine Cell Lines. *Adv Pharm Bull*. 2020;10(2).
38. Guillermo Foladori, Edgar Arteaga Figueroa, Edgar Záyago Lau, Richard Applebaum, Eduardo Robles-Belmont, Laura Liliana Villa Vásquez, Rachel Parker VL. La política pública de nanotecnología en México. *Rev Iberoam Ciencia, Tecnol y Soc*. 2017;12(34):51–64.
39. Verenise Sánchez. Los grandes riesgos de las nanopartículas [Internet]. 2018. Available from: <http://www.cienciamx.com/index.php/tecnologia/nanotecnologia/20567-grandes-riesgos-nanoparticulas>
40. Saldívar Tanaka L. Regulación blanda, normas técnicas y armonización regulatoria internacional, para la nanotecnología. *Mundo Nano Rev Interdiscip en Nanociencias y Nanotecnología*. 2019;13(24).