



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES EN EL  
CICLO CELULAR DE NEUMOCITOS EXPUESTOS A  
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ò L O G O  
P R E S E N T A:**

**LAURA BUCIO LÓPEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ  
2013**

**Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Dedicatoria

*A mi mamá, por estar conmigo siempre y en ningún momento abandonarme, por rescatarme de lo que pudo ser de mí, por ser mi mejor ejemplo para seguir adelante. Hoy estoy aquí gracias a ti y no existen palabras que puedan expresar todo este agradecimiento. No hay acto con el que pueda pagar lo que has hecho por mí. Esta tesis te la dedico principalmente a ti. Por tu sacrificio, tu entrega, tu dedicación y tu cuidado. Por todos los desvelos, enojos y preocupaciones que te he hecho pasar, por todo lo que has hecho y dado por mí, pero sobre todo y más importante que nada, por quererme, siento tu amor en cada acto que realizas por mí.*

*A mi hermana que estuvo conmigo en todo este camino, levantándome y ayudándome a seguir. Mi admiración hacia ti siempre ha sido una fuente de inspiración para seguir adelante. Gracias por apoyarme y cuidarme, he conseguido el termino de mis estudios de licenciatura y la realización de esta tesis con tu ayuda por eso también te dedico este logro.*

*A mis tíos y tías, principalmente a los que vieron por mi todo este tiempo. Los logros que he conseguido hasta ahora son en gran parte gracias a ustedes. También a mis primos que los quiero tanto y que han crecido a mi lado y que me apoyan siempre que los necesito.*

*A la Dra. Yolanda, mi asesora de tesis, que me ha ayudado a crecer no solo intelectualmente, sino también como persona. Muchas gracias por su dedicación, apoyo, enseñanzas y regaños. No puedo imaginar el oscuro futuro que me hubiera envuelto si no hubiera llegado a su laboratorio.*

*A la Dra. Norma, que ha estado con paciencia enseñándome desde que ingresé en el laboratorio y que me ayudó a armar mi proyecto de tesis. No tengo palabras para agradecerle la dedicación y el cariño con que me ha tratado.*

*A mi amada UNAM, por acogerme entre sus brazos todos estos años, por formarme intelectual, física, social, cultural y espiritualmente. Hoy más que nunca brilla mi piel dorada protegiendo mi sangre azul. "Por mi raza hablará el espíritu".*

*A mi país, México, que me vio nacer y vivir. Tus colores y tu esencia me han enamorado y hoy quiero dedicarte este logro, que en gran parte es tuyo.*

*A mis amigos, en primer lugar a mi mejor amiga Isabel, sé que nuestro camino juntas ha sido bastante tortuoso, pero quiero que sepas que no existe alguien ajeno a mi familia a quiera tanto como a ti. Muchas veces me diste fuerza para seguir con mis sueños y tus palabras me alentaron en momentos difíciles. Has visto por mí tantas veces y me has ayudado en tantas ocasiones que no tengo palabras para agradecerte. Esta tesis también es para ti, porque gracias a ti he dado este paso, un paso más para cumplir mis sueños.*

*A Erick, que ha sido mi mejor amigo desde que entré a la FESI, eres la única que persona que realmente me conoce y aun así eres mi amigo, eso no tiene precio. Siempre has estado ahí para mí, escuchándome, consolando mis penas y ayudándome. Hemos compartido tantas cosas que es imposible no quererte. Quiero agradecerte todo y darte muestra de mi cariño dedicándote esta tesis también a ti. No sé qué hubiera hecho si no hubieras estado aquí, conmigo.*

*A mis amigos del laboratorio que siempre me han apoyado, principalmente a Ingrid que fue mi maestra de laboratorio y que mucho de lo que sé de técnicas es gracias a ella. Ha sido muy divertido aprender de ti y pasar tiempo contigo, dentro y fuera del laboratorio, fue muy fácil ganarte mi cariño. A mis amigos de la FESI Tomás, Karen, Olga y Maricarmen que me han hecho crecer y que varias veces, principalmente Karen, me han mostrado diferentes enfoques sobre la carrera. La he pasado muy bien con ustedes, me he divertido mucho y me han inspirado y también por eso estoy aquí hoy.*

*Finalmente le quiero dar un espacio en este texto a aquellas personas que por alguna razón han dejado de formar parte de mi vida, principalmente a quienes fueron mis amigos, porque son y siempre serán parte de mi pasado y de lo que soy ahora.*

### **No te rindas**

*“No te rindas, por favor no cedas,  
aunque el frío queme,  
aunque el miedo muerda,  
aunque el sol se ponga y se calle el viento,  
aún hay fuego en tu alma,  
aún hay vida en tus sueños  
porque cada día es un comienzo nuevo,  
porque esta es la hora y el mejor momento.”*

**Mario Benedetti**

## **Agradecimientos**

**Esta tesis fue realizada en el laboratorio 10 de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México y apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CB-2011/166727 y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico IB201112.**

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para el desarrollo esta tesis. No. de becario 18259.**

## Contenido

- 1. Introducción**
- 2. Antecedentes**
  - 2.1. Nanomateriales
  - 2.2. Nanopartículas (NPs) de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>)
  - 2.3. Exposición de las NPs a la población
  - 2.4. Internalización de las NPs de TiO<sub>2</sub> en las células
  - 2.5. Evidencias de los efectos citotóxicos y genotóxicos de las NPs de TiO<sub>2</sub>
  - 2.6. Efectos de las NPs de TiO<sub>2</sub> en el ciclo celular
  - 2.7. Ciclo celular
  - 2.8. Regulación del ciclo celular
  - 2.9. Alteraciones en el ciclo celular
- 3. Justificación**
- 4. Hipótesis**
- 5. Objetivos**
- 6. Materiales y método**
  - 6.1. Estrategia experimental
  - 6.2. Cultivo celular
  - 6.3. Exposición a NPs de TiO<sub>2</sub>
  - 6.4. Arresto de cultivos en fase G1/S
  - 6.5. Extracción y cuantificación de ADN
  - 6.6. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo
  - 6.7. Tinción hematoxilina & eosina
  - 6.8. Obtención de índice mitótico
  - 6.9. Análisis estadístico

## **7. Resultados**

7.1. Internalización de las NPs de TiO<sub>2</sub>

7.2. Análisis de la distribución del ciclo celular

7.3. Evaluación del arresto con hidroxurea

7.4. Evaluación de la progresión del ciclo celular

7.5. Porcentaje de células mitóticas

7.6. Efecto en la cantidad de ADN

## **8. Discusión**

## **9. Conclusiones**

## **10. Recomendaciones**

## **11. Perspectivas**

## **12. Referencias**

## Índice de figuras

- Figura 1.** Clasificación de los tipos de endocitosis.
- Figura 2.** Ruta del tensoactivo pulmonar.
- Figura 3.** Internalización de NPs de TiO<sub>2</sub> en neumocitos tipo II de la línea A549.
- Figura 4.** Esquema del ciclo celular.
- Figura 5.** Mecanismo de regulación de los complejos CDK/ciclinas para la progresión del ciclo celular.
- Figura 6.** Proteínas involucradas en los puntos de restricción del ciclo celular.
- Figura 7.** Diagrama de flujo de la estrategia experimental.
- Figura 8.** Cámara de Neubauer vista a 100 aumentos.
- Figura 9.** Agregados de NPs de TiO<sub>2</sub> suspendidos en medio preparado y sonificado durante 30 minutos.
- Figura 10.** Fórmula condensada y estructura bidimensional de la hidroxurea.
- Figura 11.** Análisis de ciclo celular.
- Figura 12.** Imagen de neumocitos humanos expuestos 7 días a 0, 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs de TiO<sub>2</sub>.
- Figura 13.** Análisis del ciclo celular de neumocitos expuestos 7 días a 0, 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs de TiO<sub>2</sub> correspondientes al grupo A, cultivos no arrestados.
- Figura 14.** Efecto de la exposición a NPs de TiO<sub>2</sub> en el porcentaje de células en fase G1 después del arresto en fase G1/S con hidroxurea.
- Figura 15.** Efecto de la exposición a NPs de TiO<sub>2</sub> en el porcentaje de células en fase S después del arresto en fase G1/S con hidroxurea.
- Figura 16.** Efecto de la exposición a NPs de TiO<sub>2</sub> en el porcentaje de células en G2/M después del arresto en fase G1/S con hidroxurea.

- Figura 17.** Progresión de la fase G1 del ciclo celular después de 9 h de la liberación del arresto en fase G1/S.
- Figura 18.** Progresión de la fase S del ciclo celular después de 9 h de la liberación del arresto en fase G1/S.
- Figura 19.** Progresión de la fase G2/M del ciclo celular después de 9 h de la liberación del arresto en fase G1/S.
- Figura 20.** Porcentaje de células en mitosis de cultivos arrestados con hidroxurea en fase G1/S (Grupo B) y cultivos liberados 9 h después del arresto en fase G1/S (Grupo C).
- Figura 21.** Cuantificación de ADN total de 400 000 neumocitos expuestos 7 días a 0, 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$ .

## Resumen

**Introducción.** Las nanopartículas de dióxido de titanio (NPs de TiO<sub>2</sub>) son utilizadas en diversos productos de uso humano y representan un riesgo para la salud, ya que pueden ingresar al cuerpo por diferentes vías (oral, inhalatoria y dérmica) y ser endocitadas y acumuladas por las células. En ambientes ocupacionales las NPs de TiO<sub>2</sub> son inhaladas y llegan hasta el tejido pulmonar alterando varios procesos celulares. Por ejemplo, se ha observado que las NPs de TiO<sub>2</sub> pueden acelerar la progresión de las fases del ciclo celular (G1, S y G2/M) y posteriormente pueden llegar a inducir mutagénesis y tumorigénesis. A pesar de los daños que provocan las NPs de TiO<sub>2</sub> en el ciclo celular, existen pocos estudios que se enfoquen en estudiar este tipo de alteraciones. Por lo tanto, para contribuir al conocimiento de la toxicidad de las NPs de TiO<sub>2</sub>, se evaluaron los efectos que provocan en el ciclo celular de cultivos coordinados de neumocitos humanos.

**Materiales y método.** En cajas petri de 24 cm<sup>2</sup> se cultivaron neumocitos tipo II humanos de la línea A549 que fueron expuestos a 0, 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs de TiO<sub>2</sub> durante 7 días consecutivos. Concluido el tiempo de exposición se formaron 3 grupos: el grupo A formado por cultivos no arrestados; el grupo B formado por cultivos arrestados en la fase G1/S; y el grupo C correspondiente a cultivos arrestados en fase G1/S y posteriormente liberados para permitir la progresión del ciclo celular durante 9 h. En el grupo A se observó la internalización de NPs de TiO<sub>2</sub> y se analizó la distribución del ciclo celular. En todos los grupos se determinó el porcentaje de células en las fases G1, S y G2/M por citometría de flujo. Finalmente en los grupos B y C se determinaron los porcentajes de células mitóticas mediante microscopía contando las células de 5 campos aleatorios de 9 mm<sup>2</sup> de cada caja Petri y se cuantificó el ADN de 400 000 células por espectrofotometría (260/280 nm).

**Resultados.** En cuanto a la evaluación de la distribución del ciclo celular realizada en el grupo A solamente se observó que la fase S incrementó con el tratamiento de 10 µg/cm<sup>2</sup>. Al evaluar el arresto del ciclo celular comparando los grupos A y B se observó la disminución del porcentaje de células en fase G2/M del control y del tratamiento de 5 µg/cm<sup>2</sup> del grupo B, pero no se observó cambio en los tratamientos de 1 y 10 µg/cm<sup>2</sup>. Al observar la progresión del ciclo celular comparando los grupos B y C no se observaron diferencias significativas en los controles, sin embargo en todos los tratamientos del grupo C disminuyó el porcentaje de células en fase G1 e incrementó el porcentaje de células en G2/M indicando mayor progresión del ciclo en estos cultivos. La evaluación del índice mitótico mostró que solamente incremento el porcentaje de

células en fase M en los tratamientos de  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$  del grupo C. El análisis de la cantidad de ADN total de las células mostró que no hay diferencias entre la cantidad de ADN de los grupos B y C.

**Conclusiones.** Las NPs de  $\text{TiO}_2$  son internalizadas por los neumocitos tipo II de la línea A549 y su localización intracelular se observa principalmente en la periferia del núcleo. La exposición a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$  incrementa el porcentaje de células en fase S, además de inducir junto con la exposición a  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$ , resistencia al arresto en fase G1/S del ciclo celular. La exposición a 0, 1, 5 y  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$  provoca la aceleración de la progresión del ciclo celular de cultivos previamente arrestados y la exposición a  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$  induce el incremento en el porcentaje de células mitóticas. Estas alteraciones no se deben a variaciones en la cantidad de ADN de las células.

## 1. Introducción

Las NPs de TiO<sub>2</sub> son altamente valoradas por su buena estabilidad térmica, alta resistencia a la degradación por luz UV y a los ataques químicos, capacidad fotocatalítica, alta capacidad de recubrimiento y brillo (Baan, 2007).

Con el fin de utilizarlas en diversos productos comerciales como alimentos, cosméticos, bloqueadores solares, pinturas y calentadores solares, las NPs de TiO<sub>2</sub> son fabricadas en dos de sus formas cristalinas, rutilo y anatasa (Hext *et al.*, 2005). La producción anual de las NPs de TiO<sub>2</sub> es la más importante dentro de la ingeniería de nanomateriales (Fisichella *et al.*, 2012) y no existe una legislación específica que regule su tratamiento, lo cual incrementa la cantidad de NPs de TiO<sub>2</sub> en el ambiente y el riesgo de exposición a la población (Wang *et al.*, 2013).

La ruta de exposición a las NPs de TiO<sub>2</sub> con mayor relevancia toxicológica es la inhalatoria, a través de esta vía se exponen los trabajadores que sintetizan, empaican y transportan las NPs de TiO<sub>2</sub> y también los trabajadores que las utilizan como material para la elaboración de otros productos. Sin embargo las NPs de TiO<sub>2</sub> también pueden ser ingeridas y entrar al tracto gastrointestinal ya que es común utilizarlas como aditivo alimenticio y pueden penetrar la piel a través de productos como cosméticos y bloqueadores solares (Skocaj, 2011). Esto es importante ya que se ha demostrado que células como fibroblastos, queratinocitos, hepatocitos y neumocitos, entre otros, endocitan y acumulan NPs de TiO<sub>2</sub> (Cui *et al.*, 2010; Allouni *et al.*, 2012; Jaeger *et al.*, 2012; Tedja *et al.*, 2012).

Una vez dentro de las células, las NPs de TiO<sub>2</sub> provocan alteraciones en diversos procesos celulares. Un proceso importante que se ha visto alterado pero que ha recibido poca atención es el ciclo celular y los resultados de las evaluaciones de este proceso que han sido reportados hasta el momento son contradictorios, además no existe un trabajo que se enfoque en el estudiar el efecto de las NPs de TiO<sub>2</sub> en el ciclo celular de cultivos coordinados, (Knaapen *et al.* 2004; Wang *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Ramkumar, 2012), de tal manera que en este trabajo se propuso demostrar el efecto de la exposición a NPs de TiO<sub>2</sub> después de 7 días en el arresto y progresión del ciclo celular de neumocitos tipo II de la línea A549.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Nanomateriales

El término “nanomaterial” (NM) se refiere a cualquier material, ya sea natural, incidental o sintético que contenga al menos 50% de nanopartículas en forma de aglomerados o en forma libre. Por su parte las nanopartículas (NPs) son definidas como partículas con estructuras internas o dimensiones externas menores a 100 nm (Shi *et al.*, 2013). Su tamaño ocasiona que las NPs tengan una gran reactividad química y propiedades eléctricas, magnéticas, ópticas y térmicas diferentes a los materiales de dimensiones más grandes.

Los NMs incorporados en los productos comerciales pueden clasificarse dependiendo de su forma química en: NMs a base de carbón como los fulerenos; NMs a base de metal donde se incluyen NMs de metal como el oro y NMs de óxidos metálicos como el óxido de zinc; dendrímeros, con los cuales se forman algunos polímeros y NMs compuestos como las partículas de platinum cubiertas de sílica (Wang *et al.*, 2013). Además podemos encontrar a las NPs con distintas formas como son: nanotubos, nanocables, nanoesferas y estructuras cristalinas como los *quantum dots*, entre otras (Hallock *et al.*, 2008).

Los NMs tienen un alto rango de aplicaciones, por ejemplo, las nanopartículas de metal pueden formar cubiertas que tienen alta conductividad eléctrica, por lo que son utilizadas para fabricar productos electrónicos. En el campo de la medicina, los NMs suelen ser utilizados como vehículos para administrar de manera precisa los tratamientos, aunque también se han aprovechado sus características fisicoquímicas para desarrollar terapias. Así mismo se utilizan NMs con el fin de mejorar las propiedades organolépticas de algunos alimentos (Guozhong, 2004).

En la actualidad los NMs forman parte de muchos productos, equipos y sistemas de uso común para la población, aunque en muchas ocasiones esto no es tan evidente. Por ejemplo, las NPs de plata se utilizan como bactericida en gasas para quemaduras serias o heridas crónicas; las NPs de silicio se utilizan para formar un fuerte adhesivo entre el esmalte y las coronas en trabajos de restauración dental; las NPs de oro se utilizan para la detección de células cancerígenas, las NPs de zinc son utilizadas comúnmente como aditivos en los cereales y son incorporadas en empaques de carne, pescado, maíz para evitar su deterioro y preservar los colores (Guozhong, 2004; Xie *et al.*, 2011)

Por sus pequeñas dimensiones los NMs pueden entrar más fácilmente en el cuerpo humano y cruzar las barreras biológicas del pulmón, intestino o cerebro. Además suelen presentar propiedades diferentes a los materiales más grandes. Una propiedad destacada es que con la misma cantidad de masa, los NMs tienen mayor área superficial que los materiales de la misma naturaleza y mayor tamaño. Esta característica es muy importante porque las reacciones químicas de los materiales frecuentemente tienen lugar en su superficie, de tal manera que los NMs suelen ser más reactivos (Lövestam *et al.*, 2010).

El incremento en la producción y uso de los NMs en los productos de uso común ha generado la necesidad de evaluar el riesgo que representan tanto para el ambiente como para la salud, así mismo se ha observado que las diferencias en las propiedades de cada tipo de NPs también influyen en el efecto que causan en los organismos, de tal manera que cada tipo de NP, debe ser tratado de manera individual (Fisichella *et al.*, 2012).

## 2.2. Nanopartículas de dióxido de titanio

Dentro de los diferentes NMs las nanopartículas de dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) juegan un papel importante por su amplio uso en la industria y sus diferentes aplicaciones (Sekar *et al.*, 2011). Esto se debe a que el  $\text{TiO}_2$  es altamente valorado por su buena estabilidad térmica, alto índice de refracción (anatasa=2.55, rutilo=2.73), capacidad fotocatalítica, blancura, brillo y alta resistencia a la degradación, ya sea por luz UV o por ataques químicos. (Robichaud *et al.*, 2008).

El uso más destacado del  $\text{TiO}_2$  es la elaboración de pigmento blanco, utilizado en productos comerciales como alimentos, cosméticos, bloqueadores solares y pinturas. Para este fin el  $\text{TiO}_2$  es sintetizado en dos de sus formas cristalinas: rutilo y anatasa (Hext *et al.*, 2005).

De acuerdo a Shi *et al.* (2013) el  $\text{TiO}_2$  ocupa el 70% del total del volumen de pigmentos producidos en el mundo y aproximadamente 4 millones de toneladas de  $\text{TiO}_2$  son consumidas mundialmente por año.

Aunque el  $\text{TiO}_2$  es sintetizado en forma de partículas mayores y menores a 100 nm, las NPs de  $\text{TiO}_2$ , incrementan su porcentaje año con año con respecto al total de  $\text{TiO}_2$  producido (Robichaud *et al.*, 2008). Es decir, la proporción de NPs de  $\text{TiO}_2$  estimada en 2009 fue del 2.5% y se estima que en 2015 incrementará al 10% (Skocaj *et al.*, 2011). Las NPs de  $\text{TiO}_2$  se encuentran entre las NPs más utilizadas en productos de consumo (Shukla *et al.*, 2011).

Esto es de suma importancia, ya que las propiedades de las partículas de  $\text{TiO}_2$  difieren dependiendo de la forma cristalina y al tamaño de las partículas. Por ejemplo se ha observado que la anatasa tiene un mayor potencial tóxico que el rutilo y que las NPs de  $\text{TiO}_2$  muestran mayor toxicidad que las micropartículas de  $\text{TiO}_2$  (Shi *et al.*, 2013).

### 2.3. Exposición de la población a las NPs de TiO<sub>2</sub>

Existen diversas rutas mediante las cuales el cuerpo humano intercambia sustancias con el ambiente, las más destacadas son el tracto gastrointestinal, la piel y el sistema respiratorio. Estas rutas de intercambio son la principal entrada de NPs de TiO<sub>2</sub> al cuerpo humano, ya sea de forma consciente o incidental (Shemetov *et al.*, 2012).

Las NPs de TiO<sub>2</sub> son utilizadas con diversos fines, por ejemplo, por su capacidad fotocatalítica y anticorrosiva se usan en tratamientos para la descontaminación del agua y en la elaboración de celdas solares. En el campo médico el principal contacto con las NPs de TiO<sub>2</sub> es a través de implantes ortopédicos o dentales de titanio, ya que con la fricción, principalmente de los implantes móviles, se liberan partículas tanto micrométricas como nanométricas (Shemetov *et al.*, 2012).

En el ámbito alimenticio han sido bien aceptadas y son conocidas como el aditivo E171, el cual se utiliza para mejorar la blancura y textura de varios productos alimenticios, como quesos cottage y Mozzarella, sustitutos de crema para café, goma de mascar, leche desnatada, helado, chocolates confitados caramelos, productos con glaseado blanco o cubiertos de azúcar, mayonesa y yogurth (Weir *et al.*, 2012).

En los productos de cuidado personal, podemos encontrar NPs de TiO<sub>2</sub> son en bajas concentraciones (<0.1 µg/mg) en productos como cremas faciales, desodorantes, cremas de afeitar protectores solares, cosméticos, pastas dentales y shampoos de color blanco; además reporta que productos como pastas dentales y protectores solares contienen mayores concentraciones de este polvo (de 0.7 a 5.6 µg/mg y de 14 a 90 µg/mg respectivamente) (Skocaj, 2011; Weir *et al.*, 2012).

La Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) se encarga de regular el uso del TiO<sub>2</sub> como aditivo, sin embargo en esta regulación las partículas de TiO<sub>2</sub> de tamaño nanométrico no han sido consideradas como nuevo aditivo, sino como una variación en el tamaño de la partícula del aditivo ya existente, lo cual es un problema porque las NPs de TiO<sub>2</sub> ocasionan alteraciones en los seres vivos en distinto grado que las micropartículas de TiO<sub>2</sub> (Skocaj, 2011).

Para los protectores solares la única limitación estipulada por la FDA es que la concentración de  $\text{TiO}_2$  no rebase el 25% del total del producto (Weir *et al.*, 2012). La mayoría de protectores solares tienen entre 2 y 15% pero ya que las NPs de  $\text{TiO}_2$  son más eficaces e incoloras que las partículas de tamaño micrométrico, los productos que las contienen son preferidas por los consumidores (Nohynek y Schaefer, 2010).

El  $\text{TiO}_2$  también está incluido en la guía de ingredientes inactivos de la FDA para su uso en cápsulas orales, suspensiones, tabletas, preparaciones dermales y medicinas no parenterales. En el 2012 Weir *et al.* reportó que en la mayoría de los fármacos de alto consumo el contenido de  $\text{TiO}_2$  oscila por debajo de  $0.0001 \mu\text{g}/\text{mg}$ , sin embargo para el producto Aspirina® el contenido fue mayor con  $0.017 \mu\text{g}/\text{mg}$  y con  $10 \mu\text{g}/\text{mg}$  para su producto genérico. En el campo de la nanomedicina, la principal ruta de entrada de NPs de  $\text{TiO}_2$  al cuerpo humano es deliberada y se da por inyección cutánea o intravenosa (Shi *et al.*, 2013).

También puede ocurrir una exposición ambiental, ya que el incremento de la producción de  $\text{TiO}_2$  ha provocado el aumento de la concentración de NPs de  $\text{TiO}_2$  en el agua y suelo, de manera que también incrementa el riesgo de exposición accidental de la población (Scokaj *et al.*, 2011).

A pesar de esto, la ruta de exposición a NPs de  $\text{TiO}_2$  que tiene mayor relevancia toxicológica es la exposición aérea. Esto se debe a que el sistema respiratorio es una de las formas más comunes de intercambio con el medio ambiente por lo que las partículas pueden entrar en el cuerpo fácilmente (Shi *et al.*, 2013).

Generalmente las partículas mayores a  $2.5 \mu\text{m}$  de tamaño son removidas del tracto respiratorio por la mucosa, mientras que las partículas más pequeñas alcanzan exitosamente a los tejidos (Chen *et al.*, 2008).

La entrada de NPs de  $\text{TiO}_2$  por inhalación se da de manera más significativa en las áreas ocupacionales. En este ámbito el contacto de los trabajadores con las NPs de  $\text{TiO}_2$ , a través de esta vía se exponen los trabajadores que sintetizan, empaacan y transportan las NPs de  $\text{TiO}_2$  y también los trabajadores que las utilizan como material para la elaboración de otros productos (Hext *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2013).

Debido a este constante contacto con las NPs se han establecido límites de exposición aérea. Para México el límite de exposición es de  $10 \text{ mg/m}^3$  para una jornada laboral normal de 8 horas (Baan, 2007), sin embargo en el 2011 el Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH), basado en los efectos tóxicos del  $\text{TiO}_2$  que se han reportado, recomendó un límite de exposición aérea de NPs de  $\text{TiO}_2$  de  $300 \text{ }\mu\text{g/m}^3$  en hasta 10 h al día durante una semana laboral de 40 h.

A pesar de esto Koivisto *et al.* reportan que el promedio de la exposición a partículas de  $\text{TiO}_2$  de los trabajadores en las fábricas en el 2012, fue de 225 a  $700 \text{ }\mu\text{g/m}^3$  y que más del 90% de las partículas medían menos de 100 nm, superando los límites recomendados por la NIOSH.

#### 2.4. Internalización de las NPs de TiO<sub>2</sub> en las células

Una vez que las NPs de TiO<sub>2</sub> han entrado en el cuerpo, éstas pueden ser captadas por las células y acumularse dentro de ellas (Skocaj *et al.*, 2011). Bajo condiciones fisiológicas, las NPs pueden entrar a las células por vía pasiva y transporte activo pero la mayoría de las células entran por endocitosis. La endocitosis sirve para absorber moléculas del espacio intracelular por invaginación de la membrana plasmática y la formación de vesículas intracelulares (Fröhlich, 2012).

Comúnmente los tipos de endocitosis se clasifican en: endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolas, macropinocitosis y endocitosis independiente de clatrina y de caveola (Figura 1). Todas las vías llevan su contenido a endosomas donde se transportan a, endosomas tardíos y posteriormente a lisosomas. El contenido de los caveolosomas también puede derivar en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Fröhlich, 2012).

La captación y localización intracelular de las NPs de TiO<sub>2</sub> depende tanto del tipo de célula como de las propiedades de las partículas (Skocaj *et al.*, 2011). Algunas de las propiedades de las NPs que influyen en su captación celular son el tamaño, el área superficial, la superficie química, carga, cristalinidad, forma, solubilidad y estado de aglomeración o agregación (Skocaj *et al.*, 2011).

En cuanto al tamaño se sabe que las células no fagocíticas captan NPs esféricas de entre 20 y 50 nm, mientras que los fagocitos captan preferentemente NPs con tamaños entre 300 nm y 5µm (Fröhlich, 2012).

La captación de NPs de TiO<sub>2</sub> se ha observado en diferentes células, por ejemplo en: queratinocitos humanos (Kocbek, *et al.*, 2010), fibroblastos (Allouni *et al.*, 2012), linfocitos (Kang *et al.*, 2008), células del epitelio bronquial de humano (Hussain *et al.*, 2010) y neumocitos tipo II (Stearns, 2001).

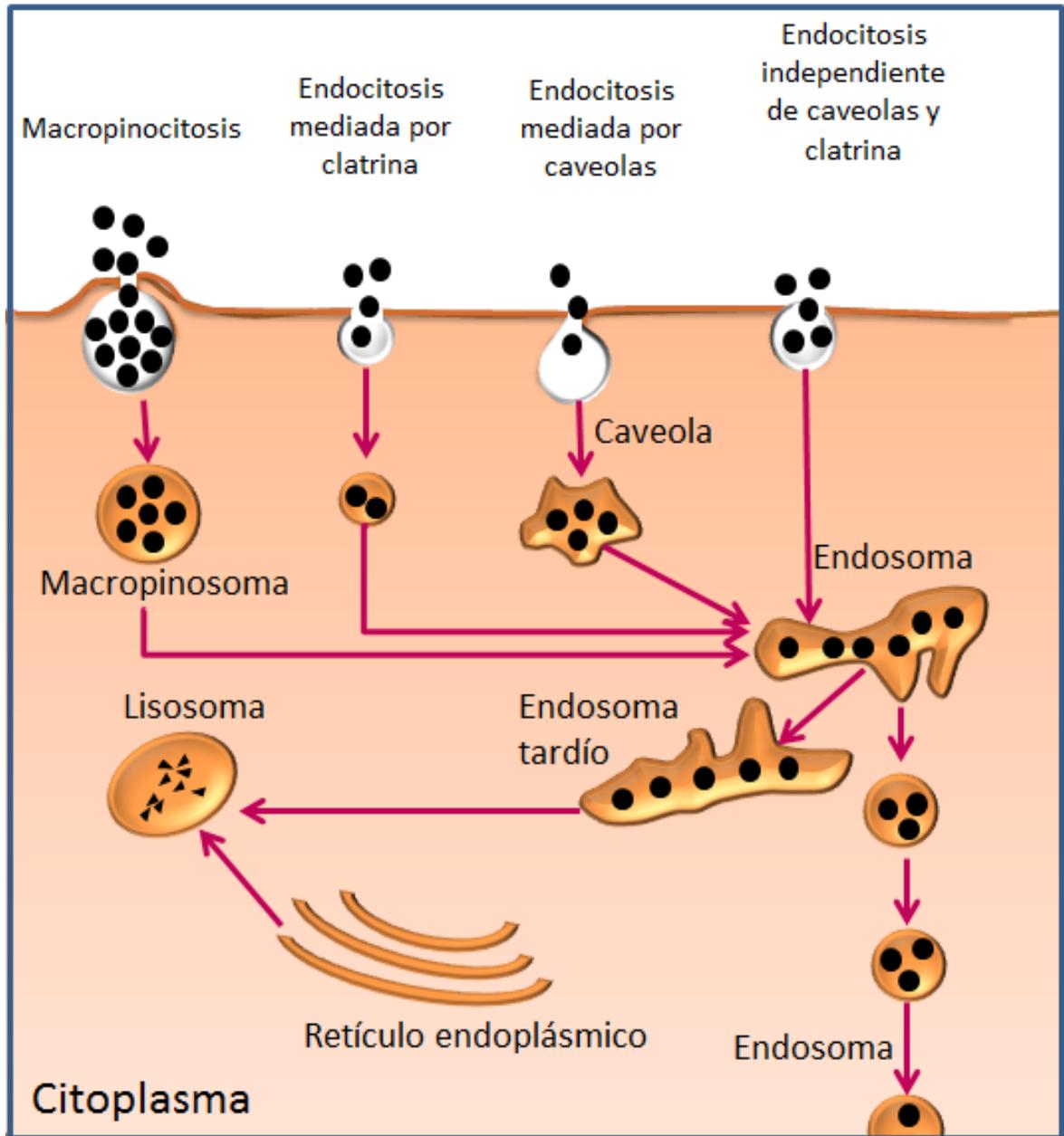


Figura 1. Clasificación de los tipos de endocitosis (figura modificada de Fröhlich, 2012)

## 2.5. Internalización de las NPs de $TiO_2$ en neumocitos tipo II

Ya que el modelo de estudio en este trabajo son los neumocitos tipo II de humano de la línea A549 es importante conocer acerca de las funciones que estas células llevan a cabo en el cuerpo y la manera en la que sus características influyen para la internalización.

El epitelio pulmonar está compuesto principalmente por dos tipos de células, los neumocitos tipo I y tipo II. Los neumocitos tipo I cubren aproximadamente el 96% de la superficie del epitelio pulmonar y son incapaces de dividirse y los neumocitos tipo II, aunque cubren menor área superficial del alveolo son más numerosos (Foster *et al.*, 1998).

Una de las funciones de los neumocitos tipo II es la formación del tensoactivo pulmonar, el cual forma una capa entre el líquido que rodea las células y el espacio alveolar, reduciendo la tensión superficial del alveolo y facilitando la respiración (Wang y Peterson, 2013).

Los componentes del tensoactivo pulmonar son sintetizados en los poliribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y cuerpos multivesiculares. Posteriormente es almacenado en organelos característicos de los neumocitos tipo II denominados cuerpos lamelares. Para formar la cubierta alveolar, el tensoactivo es exocitado a la membrana, donde algunas de las proteínas que lo componen son organizadas en una estructura parecida a un enrejado denominada mielina tubular (Figura 2) (Schmitz y Müller, 1991 y Saxena, 2005).

Una parte del tensoactivo extracelular (25% - 95%) es tomado por los neumocitos tipo II, donde se cataliza y transporta dentro de los cuerpos lamelares para su reciclaje. La otra parte es fagocitada por los macrófagos para ser eliminado. La captación del surfactante se da por dos vías endocíticas, una mediada por receptores dependientes de clatrina y una mediada por actina e independiente de clatrina (Saxena, 2005; Bates, 2009Wang; Peterson, 2013).

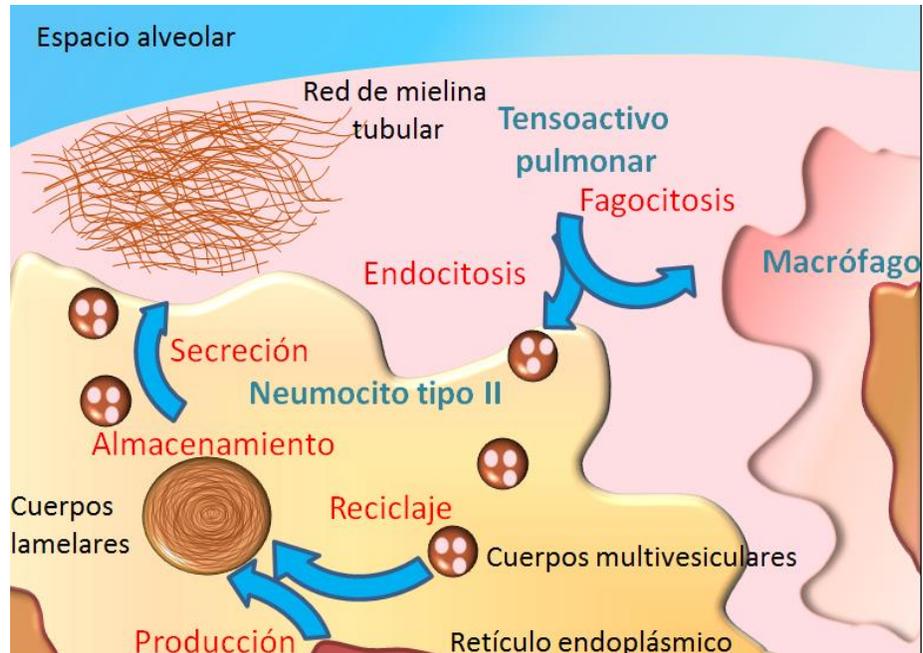


Figura 2. Ruta del tensoactivo pulmonar (figura modificada de Saxena, 2005).

La línea celular A549 utilizada en este trabajo, muestra rasgos característicos de neumocitos tipo II, incluyendo los cuerpos lamelares y las propiedades de metabolismo y transporte (Foster *et al.*, 1998). Stearns (2001) evaluó la captación de las NPs de  $\text{TiO}_2$  por las células A549 y determinó que la endocitosis es el mecanismo de internalización y que este proceso se da de manera continua durante todo el experimento (24 h), además observó que la mayoría de las partículas endocitadas se encontraba en forma de aglomerados (Figura 3).

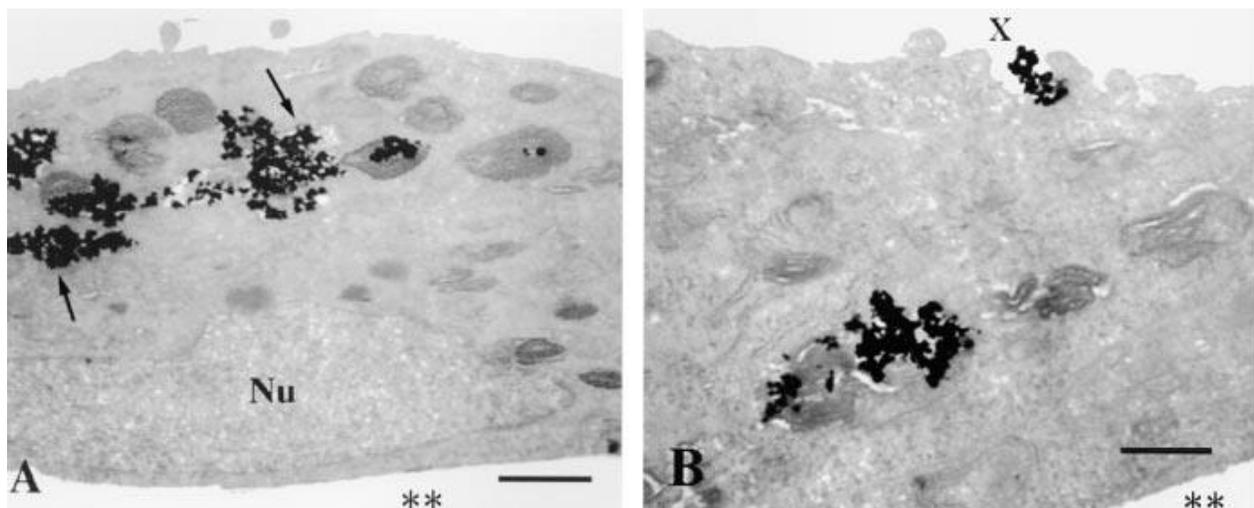


Figura 3. Internalización de NPs de  $\text{TiO}_2$  en neumocitos tipo II de la línea A549 (Stearns, 2001).

## 2.6. Evidencias de los efectos tóxicos de las NPs de TiO<sub>2</sub>

Existen varios estudios que reportan que las NPs de TiO<sub>2</sub> producen efectos tóxicos. Entre los trabajos *in vivo*, está lo reportado por Bermudez *et al.* quienes en el 2004 después de exponer ratas hembras a 10 mg/m<sup>3</sup> por 6 h al día, 5 días a la semana durante 13 semanas y posteriormente esperar a su recuperación por 4, 13, 26, 49 y 52 semanas, observaron que los organismos presentaban inflamación pulmonar y toxicidad, las cuales disminuyeron con el tiempo de postexposición. Además de esto observaron cambios en la proliferación de células del epitelio alveolar y fibrosis, las cuales se mostraron más pronunciadas con el incremento en el tiempo de postexposición.

En el 2006 Chen *et al.* reportaron que la instilación 0.5 mg de NPs de TiO<sub>2</sub> durante 1 semana provoca en ratones la proliferación de neumocitos tipo II, ruptura alveolar, incremento en el grosor del epitelio alveolar y acumulación de partículas en macrófagos.

Li *et al.* en el 2010 reportaron que ratones CD-1 inyectados con 10, 50, 100 y 150 mg/kg NPs de TiO<sub>2</sub> durante 14 días muestran acumulación de Ti en el hígado e interacción de las NPs de TiO<sub>2</sub> con el ADN con las células del tejido hepático. De acuerdo a los autores, esta interacción ocasiona fragmentación y cambios en la conformación del ADN. Por su parte Cui *et al.* (2012) reportan que la administración intragástrica de 10 mg/kg de NPs de TiO<sub>2</sub> por 90 días genera respuesta inflamatoria y apoptosis de hepatocitos.

También se han realizado diversos ensayos *in vitro*, que muestran el daño que las NPs de TiO<sub>2</sub> pueden causar; entre estos se encuentra el trabajo de Bhattacharya *et al.* (2009), quienes reportaron el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células derivadas de fluido bronquio alveolar (BEAS-2B) después de ser expuestas 6 h a 5, 10 y 50 µg/cm<sup>2</sup> de NPs de TiO<sub>2</sub>.

En células de embrión de hámster chino expuestas a 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs de TiO<sub>2</sub> de rutilo y anatasa durante 24 h, Guichard *et al.* (2012) reportaron la producción de ROS. En este trabajo también se observó que al ser expuestas a 25 y 50 µg/cm<sup>2</sup> las células manifiestan daño al ADN y formación de micronúcleos.

## 2.7. Efecto de las NPs de TiO<sub>2</sub> en el ciclo celular

Un importante proceso que se ha visto afectado por las NPs de TiO<sub>2</sub> es el ciclo celular. Tal es el caso de lo reportado por Saquib *et al.* quienes en el 2012 observaron que células de epitelio amniótico humano tratadas con 2.5, 5 y 10 µg/mL de NPs de TiO<sub>2</sub> presentan el incremento de células en fase G2/M. Por su parte Wang *et al.* (2011) reportaron un efecto similar al tratar células de ovario de hámster chino con 40 µg/ mL de NPs de TiO<sub>2</sub> durante 60 días.

Así mismo Chen *et al.* (2006), observaron que tejido pulmonar de ratones tratados con 0.1 y 0.5 /kg de NPs de TiO<sub>2</sub> durante 7 días muestran la sobreexpresión de genes correspondientes a la CDK1 y a las ciclinas B1, E1 y D, los cuales están involucrados en la regulación del ciclo celular.

Por su parte Huang *et al.* en el 2009 observaron la progresión de fibroblastos a través del ciclo celular después de ser arrestados en la fase G2/M con nocodazol y encontró que las células tratadas con NPs de TiO<sub>2</sub> progresaban a través de la fase M pero posiblemente morían por apoptosis al siguiente ciclo.

En el 2012, Ramkumar *et al.* reportaron la acumulación de células en fase G2/M después ser expuestas a 2, 5 y 10 µg/mL de NPs de TiO<sub>2</sub> y sugieren que la inducción del arresto lleva a la muerte celular por apoptosis.

## 2.8. Ciclo celular

El crecimiento de las células es esencial para el desarrollo de los organismos multicelulares e involucra el incremento tanto de la biomasa como del número de células (Goranov *et al.*, 2009). El proceso encargado de la producción coordinada de nuevas células es el ciclo celular, el cual es una serie ordenada de eventos responsables del crecimiento y duplicación de cada célula. En células eucariotas este proceso está dividido en cuatro fases: G1, S, G2 y M (Figura 4) (Johnson y Walker, 1999; Arellano y Moreno, 1997).

Durante la fase G1 la célula puede proliferar, mantenerse quiescente, entrar en arresto senescente o ir a apoptosis. Para poder continuar el ciclo celular y proliferar, se deben integrar señales mitogénicas a la célula, la cual debe tener además la tasa de síntesis de proteínas y tamaño adecuados. A progresar el ciclo celular la célula prepara su entrada a la fase S sintetizando RNAm y proteínas necesarias para la replicación y empaquetamiento del ADN (Neganova y Lako, 2008; Goranov *et al.*, 2009).

La síntesis de ADN es el principal evento de la fase S y en esta fase, la regulación se da principalmente para asegurar que solamente se lleve a cabo una ronda de replicación de ADN por ciclo celular (Johnson y Walker, 1999; Duursma y Agami, 2005).

Al terminar la replicación, la célula atraviesa por otro intervalo conocido como G2 en el cual se prepara para el proceso de división. Posteriormente la célula entra a la fase M, en la cual los cromosomas replicados son segregados en núcleos separados y ocurre la citocinesis para formar dos células hijas (Johnson y Walker, 1999).

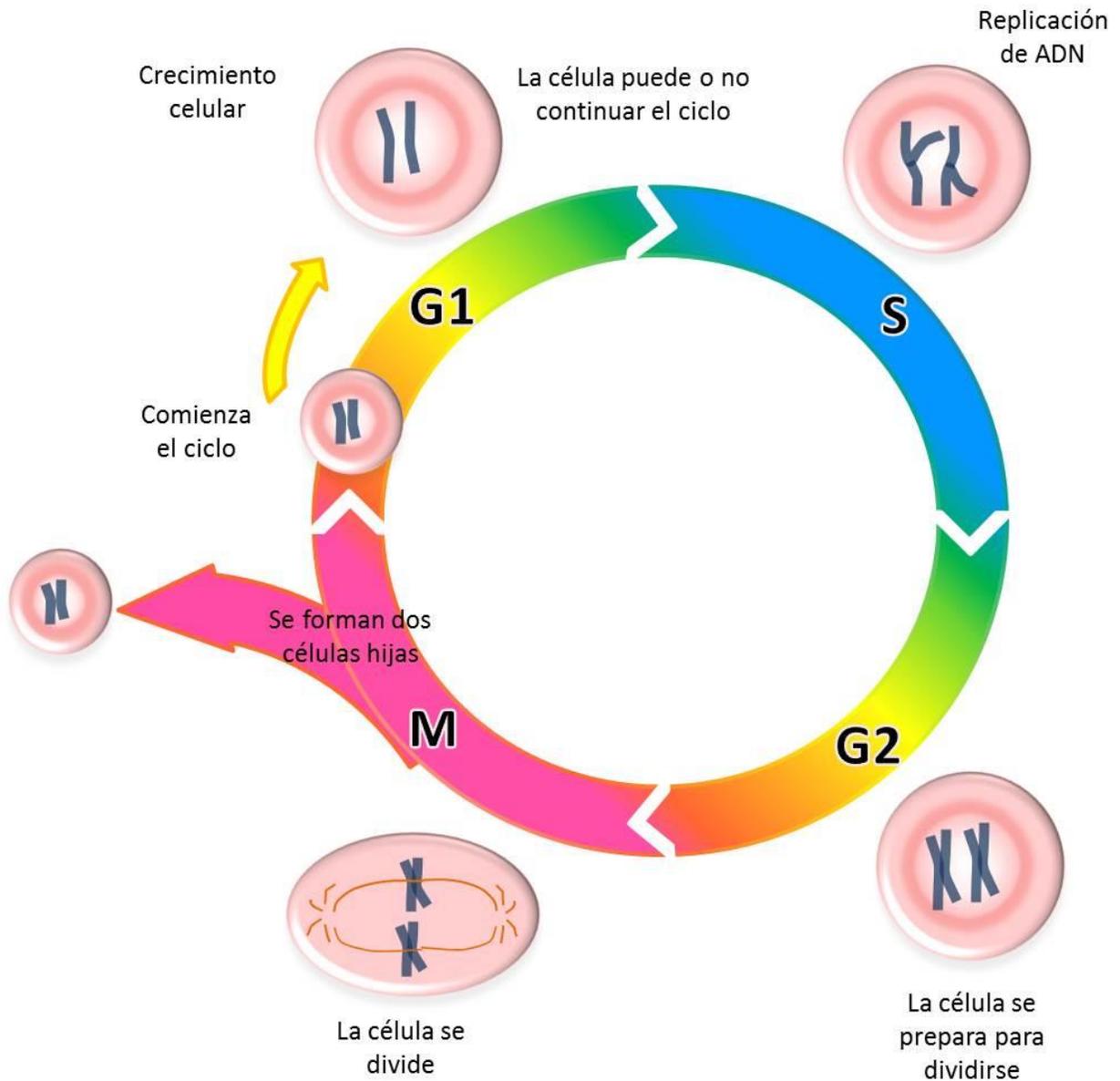


Figura 4. Esquema del ciclo celular. Se muestran las fases del ciclo celular y sus principales eventos.

## 2.9. Regulación del ciclo celular

La progresión de las células eucarióticas a través del ciclo celular es mediada por la activación e inactivación secuencial de enzimas encargadas de la fosforilación de proteínas, las cuales son denominadas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Collins y Garrett, 2005).

Mientras que en las levaduras el ciclo celular está regulado por una sola CDK, en las células humanas hay al menos 13 CDKs, de las cuales solamente las CDK1, 2, 4 y 6 se encargan de regular el ciclo celular (Figura 5) (Arellano y Moreno, 1997 y Malumbre y Barbacia, 2009).

La fosforilación de las subunidades CDK puede regular positiva o negativamente su actividad. En la regulación positiva se sabe que las CDKS monoméricas tienen muy baja actividad cinasa, por lo que requieren la unión de subunidades denominadas ciclinas como un paso inicial a su proceso de activación. Se ha observado que la actividad enzimática de una CDK unida a una ciclina es 40 000 veces más alta que la actividad de la CDK monomérica (Arellano y Moreno, 1997; Johnson y Walker, 1999). Estructuralmente la unión de una ciclina ocasiona un rearrreglo de los residuos catalíticos en el sitio de unión de la CDK al ATP, provocando así su activación (Arellano y Moreno, 1997). En la regulación negativa la proteólisis mediada por ubiquitina tiene un papel importante, ya que la destrucción de CDKs puede ser activada por ciertas ciclinas.

Aunque las transiciones de la célula a través de su ciclo de división celular, así como su entrada a reposo (G0), son procesos dependientes de complejos CDK/ciclina específicos se ha observado que diferentes ciclinas pueden unirse a la misma CDK. Esta especificidad depende en gran parte de una región conservada en las CDKs de 16 residuos aminoácidos denominada PSTAIRE que determina cual ciclina se une a cada CDK (Arellano y Moreno, 1997; Collins y Garrett, 2005).

Las ciclinas son proteínas sintetizadas y destruidas a tiempos específicos durante el ciclo celular. Hasta el momento se han reportado 25 ciclinas, de las cuales las que participan en la regulación del ciclo celular son las ciclinas de tipo A, B, D y E (Malumbre y Barbacia, 2009).

Además de la regulación por ciclinas, existen otras proteínas que controlan la actividad de las CDKs durante el ciclo celular denominadas inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKIs). Existen dos familias de CKIs, la familia Cip/Kip y la familia INK4. En mamíferos, los miembros de la

familia Cip/Kip son las proteínas p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup> y pueden actuar en la mayoría de los complejos CDK/ciclina e incluso en algunas cinasas no relacionadas con las CDKs. A la familia INK4 pertenecen las proteínas p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>, p18<sup>INK4C</sup> y p19<sup>INK4D</sup>. Estas proteínas interactúan solamente con la CDK4 y CDK6 y previenen su asociación con las ciclinas tipo D (Johnson y Walker, 1999; Heuvel *et al.*, 2005).

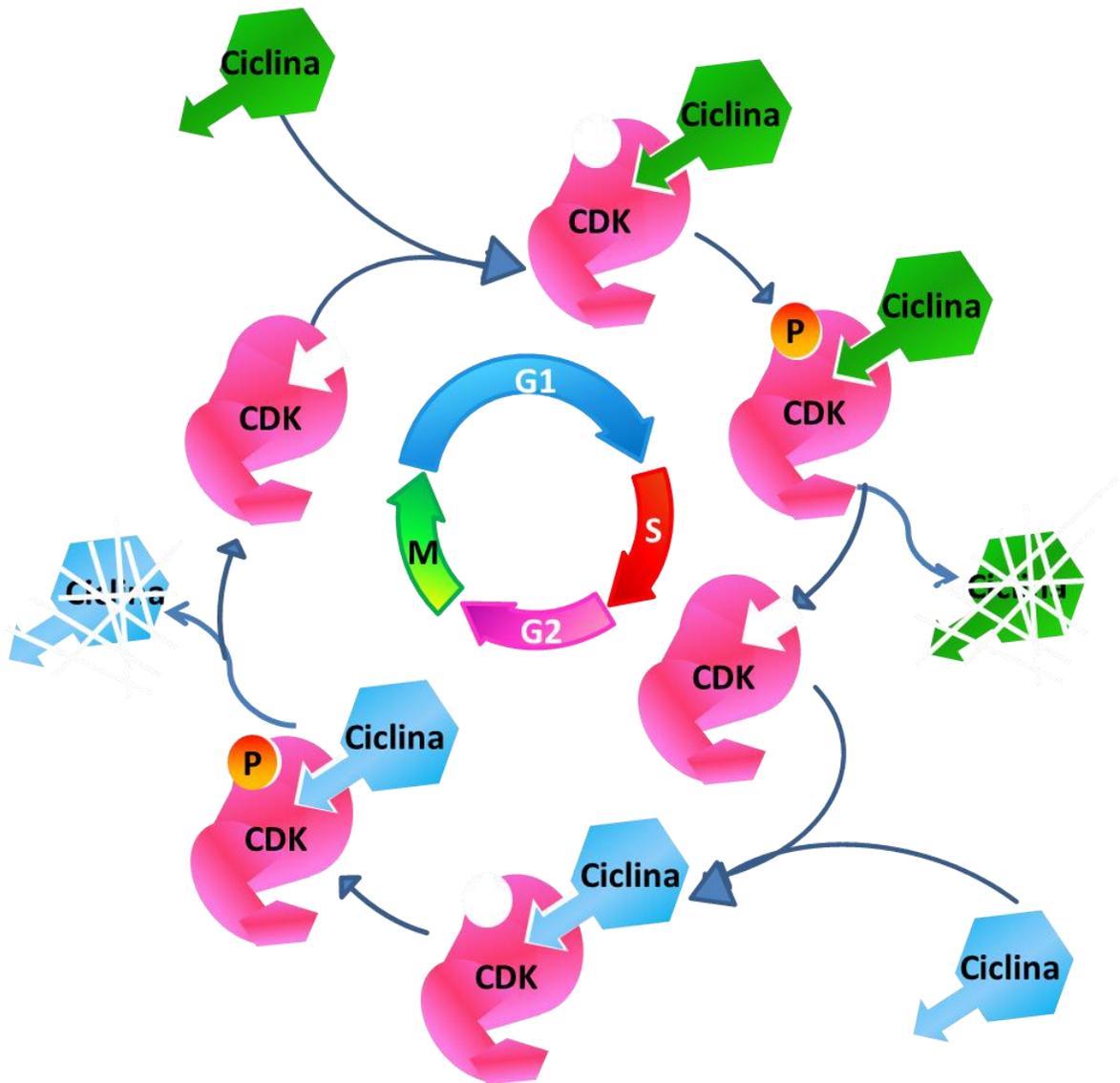


Figura 5. Mecanismo de regulación de los complejos CDK/ciclinas en la progresión del ciclo celular.

## 2.10. Puntos de restricción del ciclo celular

La apropiada progresión a través del ciclo celular es monitoreada por puntos de chequeo que detectan posibles defectos y mantienen la estabilidad genómica antes, durante y después de la replicación del ADN (Malumbre y Barbacia, 2009) (Figura 6). Para inducir la progresión del ciclo celular las ciclinas tipo D estimulan a las células en la fase G1. A diferencia de otras ciclinas, las ciclinas tipo D no oscilan durante el ciclo celular, si no que sus niveles son controlados por la presencia o ausencia de factores de crecimiento (Johnson y Walker, 1999).

El principal sustrato para los complejos CDK 4,6/ciclina tipo D es la proteína supresora del retinoblastoma (pRb). Esta proteína funciona como un inhibidor de la progresión del ciclo celular ya que está unida a factores de crecimiento que regulan la expresión de genes que codifican algunas proteínas de fase S como la ciclina E, ciclina A, CDK1, B-myb, dihidrofolato reductasa, timidina cinasa y DNA polimerasa  $\alpha$ , Cdc25A entre otras. Entre los factores de crecimiento unidos a la pRb más conocidos están los miembros de la familia E2F (Johnson y Walker, 1999).

La unión de Rb a estos factores de crecimiento inhibe la capacidad activación transcripcional de los factores y en algunos casos convierte factores de activación transcripcional de la familia E2F en represores transcripcionales. Sin embargo, bajo condiciones que favorecen la proliferación, las CDKs inactivan por fosforilación a Rb, dando como resultado la liberación de E2F y otros factores de crecimiento unidos a Rb que activan la transcripción de genes de fase S. Este punto en el ciclo celular es conocido como punto de restricción G1/S (Neganova y Lako 2008).

En esta fase del ciclo celular las proteínas inhibitorias p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>, p18<sup>INK4C</sup>, p19<sup>INK4D</sup>, p21<sup>CIP</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup> actúan en contra de la actividad mitogénica de las CDKs. Se piensa que los complejos CDK4, 6/ciclina D, juegan un segundo papel no catalítico en la progresión de G1 secuestrando proteínas de la familia Cip/Kip, incluyendo p21<sup>CIP</sup> y p27<sup>Kip1</sup> (Neganova y Lako 2008).

La ciclina E es la siguiente ciclina en ser inducida durante la progresión de las células a través de la fase G1. Esta ciclina se asocia con la CDK2 para promover la transición de la fase G1 a S. El complejo CDK2/ciclina E participa manteniendo a Rb en estado hiperfosforilado, lo cual funciona como retroalimentación para la acumulación de E2F (Johnson y Walker, 1999). Por su parte Cdc25A defosforila y activa a los complejos CDK2/ciclina E y CDK2/ ciclina A (Neganova y Lako, 2008).

La actividad de la ciclina A también es regulada en parte por E2F. Esta ciclina es acumulada en la transición G1/S y persiste a través de la fase S. Durante la transición G1/S, la ciclina A se encuentra asociada con la CDK2 para entrar en fase S y comenzar la replicación del ADN, posteriormente, en la fase S tardía se asocia con CDK1 para completar la fase S y entrar a la fase M. Se ha observado que la ciclina A se colocaliza en sitios de replicación de ADN, sugiriendo que la ciclina A puede participar activamente en la síntesis de ADN o tener un papel importante en la prevención del exceso de replicación de ADN (Johnson y Walker, 1999; Duursma y Agami, 2005)

La fase G2 también contiene puntos de restricción que responden al daño en el ADN y provoca el retraso en el ciclo celular que permite la reparación del ADN antes de que la célula entre en mitosis, Los transductores principales de esas señales son las cinasas de punto de control del ciclo celular CHK1 y CHK2 los cuales actúan indirectamente en las CDKs a través de su capacidad de inhibir a los miembros de la familia CDC25 de especificidad dual que defosforilan y activan a las CDKs (Johnson y Walker, 1999; Collins y Garrett, 2005).

La mitosis es regulada por la CDK1 asociada a las ciclinas A, B1 y B2. La actividad del complejo CDK1/ciclina A está asociada a proteínas que fosforilan los complejos CDK1/ciclina están proteínas del citoesqueleto, laminas, histona H1 y posiblemente componentes del eje mitótico. Para salir de la mitosis la CDK1/ciclina B participa en la destrucción de las ciclinas A y B para salir de la mitosis. Después de la mitosis, las células vuelven a entrar a la fase G1, donde deciden si procede la entrada a otro ciclo celular (Johnson y Walker, 1999).

Dada la importancia de las ciclinas en la regulación de la progresión del ciclo celular, es evidente que la sobreexpresión o desregulación de las ciclinas puede acelerar, retardar o arrestar el ciclo celular, influyendo de manera directa en la proliferación (Xu *et al.*, 2011).

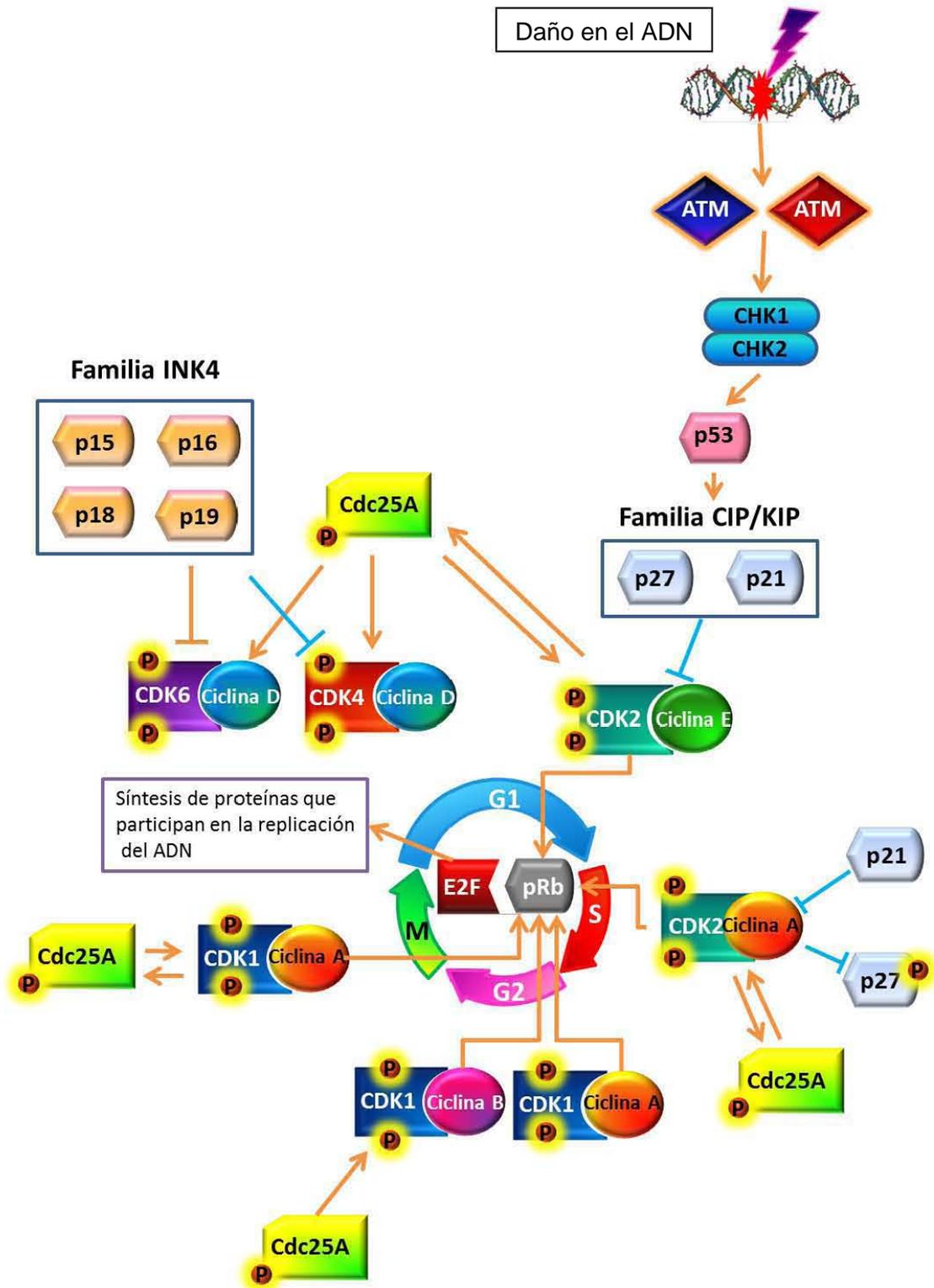


Figura 6. Proteínas involucradas en los puntos de restricción del ciclo celular.

### **3. Justificación**

Aunque existen diversos trabajos que muestran el daño que las NPs de TiO<sub>2</sub> provocan en el ciclo celular, los resultados que se muestran son contradictorios. Así mismo es importante realizar estudios en cultivos de células con el ciclo celular coordinado, sin embargo no existen trabajos de este tipo con NPs de TiO<sub>2</sub>.

Por otra parte, aunque la ruta de exposición con más relevancia toxicológica es la aérea, no hay suficientes trabajos que se enfoquen en investigar de qué manera las NPs de TiO<sub>2</sub> afectan el ciclo celular de las células de pulmón. Por este motivo es indispensable realizar estudios que reúnan las características necesarias para comprender el efecto de las NPs de TiO<sub>2</sub> en la regulación del ciclo celular.

## 4. Hipótesis

Cultivos de neumocitos tipo II humanos expuestos durante 7 días a 0, 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$  mostrarán resistencia al arresto celular, así como aceleración en la progresión del ciclo celular.

## 5. Objetivos

### 5.1. *Objetivo general*

Evaluar el efecto de la exposición a 0, 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$  durante 7 días en el ciclo celular de cultivos de neumocitos tipo II.

### 5.2. *Objetivos particulares*

- 5.2.1. Observar la internalización de las NPs de  $\text{TiO}_2$  en los neumocitos
- 5.2.2. Determinar el efecto de las NPs de  $\text{TiO}_2$  en el arresto celular en fase G1
- 5.2.3. Evaluar la distribución del ciclo celular de neumocitos tratados con NPs de  $\text{TiO}_2$
- 5.2.4. Analizar el efecto en la progresión del ciclo celular de células previamente arrestadas
- 5.2.5. Determinar si existen cambios en el porcentaje de mitosis
- 5.2.6. Evaluar el efecto en la cantidad de ADN

## 6. Materiales y método

### 6.1. Estrategia experimental

Se cultivaron neumocitos tipo II humanos, los cuales fueron tratados con 0, 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$  durante 7 días. Posteriormente se organizaron en tres grupos (Figura 7):

Grupo A	Cultivos tratados 7 días con NPs de $\text{TiO}_2$
Grupo B	Cultivos tratados 7 días con NPs de $\text{TiO}_2$ y arrestados en fase G1/S
Grupo C	Cultivos tratados 7 días con NPs de $\text{TiO}_2$ , arrestados en fase G1/S y liberados del arresto para permitir la progresión coordinada del ciclo durante 9 h.

Los análisis realizados a cada grupo fueron:

Grupo A: análisis de la distribución del porcentaje de células en el ciclo celular mediante citometría de flujo y tinción con eosina y hematoxilina para observar la internalización de las NPs de  $\text{TiO}_2$  en las células.

Grupo B y C: análisis de la distribución del porcentaje de células en el ciclo celular mediante citometría de flujo, obtención de índice mitótico y cuantificación de ADN total de 400 000 células.



## 6.2. Cultivo celular

Células del epitelio pulmonar humano de la línea A549 fueron cultivadas en cajas Petri (10 500 células/cm<sup>2</sup> de la caja Petri) con medio F12-K (In vitro s.a., ME-038) y suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Biowest, US1520). Los cultivos se mantuvieron a 37°C, con 80% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

Para realizar los subcultivos se decantó el medio y se agregó Tripsina al 0.05% con EDTA-4Na al 0.02 % (In vitro s.a., EN-008) con el fin de despegar las células. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos para eliminar la tripsina. Las células fueron resuspendidas en 1 mL de medio preparado.

Para contar las células, se tomó una muestra de medio con células (10 µL), la cual fue contrastada con 10 µL de azul tripano (In vitro s.a., SR-15) al 0.08% en buffer fosfato salino (PBS). Posteriormente se colocaron 10 µL de la muestra contrastada en una cámara de Neubauer. El conteo se realizó a 100 aumentos en un microscopio invertido, donde se contaron las células de los cuadrantes de 1 mm de las esquinas (Figura 8).

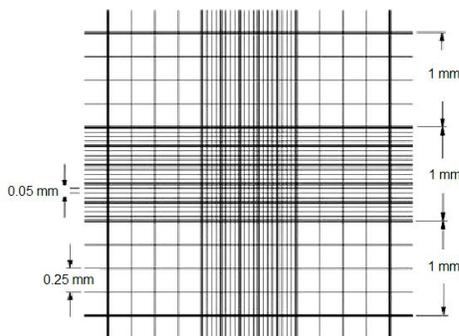


Figura 8. Cámara de Neubauer vista a 100 aumentos (10x).

El número total de células suspendidas en el medio se determinó con la siguiente fórmula:

$$\frac{[\Sigma \text{ células/cuadrante}] [\text{Volumen de medio (mL)}] [\text{factor de dilución x 10 000}]}{4}$$

4

Finalmente se sembraron 250 000 células por caja Petri para su posterior tratamiento.

### 6.3. Exposición a NPs de $\text{TiO}_2$

Cada cultivo celular se expuso a NPs de  $\text{TiO}_2$ . Para esto se utilizaron NPs de  $\text{TiO}_2$ -anatasa de 25 nm de diámetro (Sigma-Aldrich, no cat. 637254-50G) las cuales fueron suspendidas en medio preparado (1 mg/mL) y sonicadas por ciclos de 3 minutos durante media hora con el fin de lograr su dispersión (Figura 9).

Ya que las cajas de cultivo celular utilizadas miden 24 cm<sup>2</sup> de área, se agregaron 24, 120 y 240 mL de la suspensión sonicada de NPs de  $\text{TiO}_2$  para lograr las concentraciones de 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$  respectivamente.

Después de 3 días de exposición, se realizó un subcultivo de cada tratamiento. Cada subcultivo fue expuesto nuevamente a sus respectivas concentraciones de NPs de  $\text{TiO}_2$ . Siete días después de la primera exposición a NPs de  $\text{TiO}_2$ , las células fueron procesadas para los análisis correspondientes.

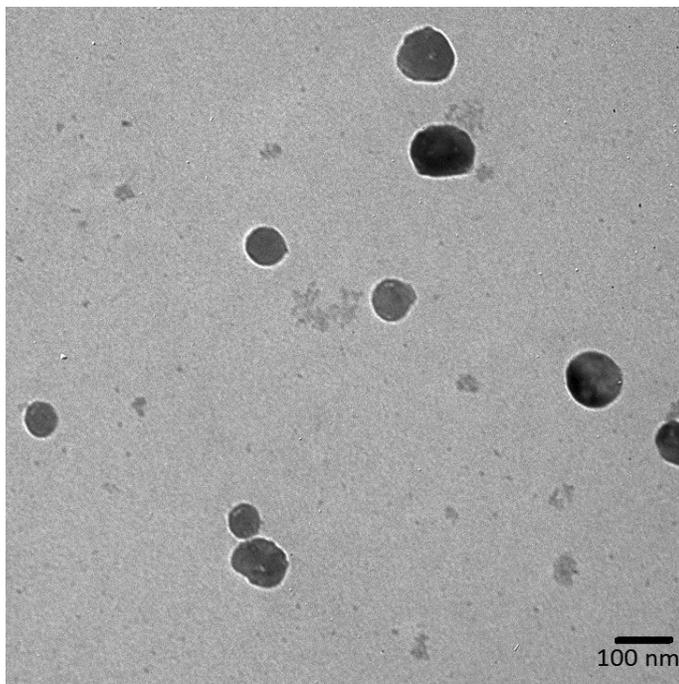


Figura 9. Agregados de NPs de  $\text{TiO}_2$  suspendidos en medio preparado y sonicado durante 30 minutos (Imagen proporcionada por la M. B. Verónica Freyre Fonseca, 2012, en el Posgrado de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional).

#### 6.4. Arresto de cultivos en fase G1/S

Ya que la progresión coordinada de los cultivos a través de las fases del ciclo celular, es considerado uno de los mejores determinantes del crecimiento de las células, los cultivos fueron arrestados en fase G1/S para sincronizar su estadio en el ciclo celular (Nayab *et al.*, 2006).

Los cultivos fueron inicialmente arrestados en la fase G0/G1 mediante privación de suero durante 48 h (Medio F12-K con 0.1% de FBS), posteriormente se indujo su arresto reversible en interfase G1/S mediante la exposición de los cultivos a medio preparado con 0.8 mM de hidroxiiurea (Sigma, H8627-1G) durante 24 h.

La hidroxiiurea (Figura 10) es un análogo de la urea que inhibe a la enzima ribonucleótido reductasa (RNR). La RNR es responsable de la producción de los desoxirribonucleótidos (dNTPs) necesarios para la síntesis de ADN, de tal manera que la inhibición de esta enzima impide la síntesis de ADN (Lori y Lisiewicz, 2000).

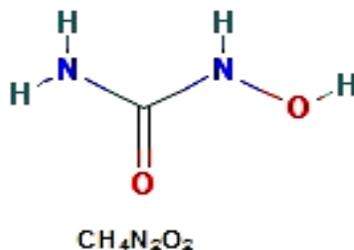


Figura 10. Fórmula condensada y estructura bidimensional de la hidroxiiurea.

Para liberar los cultivos del arresto, se retiró el medio con hidroxiiurea del cultivo, se enjuagó la caja 3 veces con PBS y se añadió medio preparado. En este trabajo los cultivos correspondientes fueron liberados durante 9 h antes de procesarlos para su análisis.

#### 6.5. Extracción y cuantificación de ADN

Se extrajo el ADN de  $4 \times 10^5$  células de los cultivos 0 h y 9 h utilizando el Kit de extracción KAPA Express Extract DNA Extraction Kit with PCR ReadyMix™ (Kapa Biosystems®, KK7151) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó el ADN en un espectrofotómetro.

### 6.6. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo

Para determinar la cantidad de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular, se puede hacer un ensayo de ciclo celular por citometría de flujo. El ensayo se basa en clasificar las células dependiendo de la cantidad de ADN que poseen. Esto es posible porque el yoduro de propidio se intercala en el ADN, de tal manera que en un citómetro de flujo se pueden agrupar las células dependiendo de la cantidad de ADN que contengan. Las células diploides son clasificadas como células en fase G1; las células tetraploides se clasifican como células en fase G2 o M; y las células que se encuentran en el intervalo entre estos dos grupos se clasifican como células en fase S (Figura 11).

Para realizar este análisis se despegaron las células de cada grupo con PBS-EDTA (0.5 mM), se lavaron 3 veces con PBS por centrifugación (1500 rpm, 5 min a 4°C) y se resuspendieron en PBS (1 mL por  $2 \times 10^6$  células). Finalmente se fijaron y permeabilizaron añadiendo la suspensión celular en un tubo Falcon de 15 mL con 8 mL de etanol al 70%.

Para teñir el ADN, se lavaron las células por centrifugación en PBS frío y se resuspendieron en 500  $\mu$ L de una solución con 0.1 mg de RNAsa A (Sigma-Aldrich, 9001-99-4) y 400  $\mu$ L de solución de yoduro de propidio (0.5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, 25535-16-4) y se incubaron a 37 °C durante 15 min. Finalmente las células se analizaron en un citómetro de flujo (FACScalibur™).

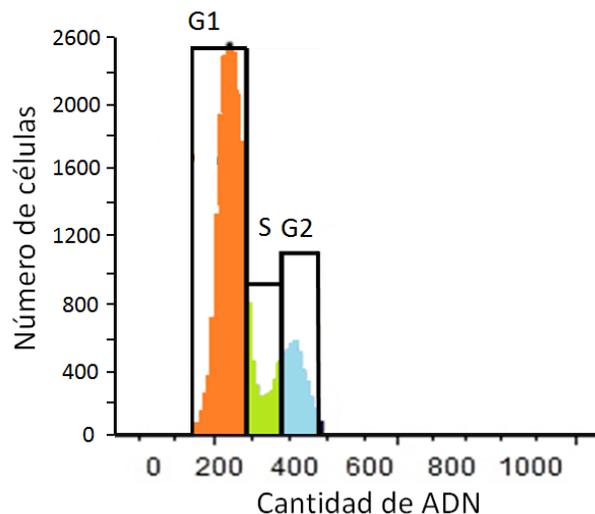


Figura 11. Análisis de ciclo celular. Se observa la clasificación de las células de un cultivo por su cantidad de ADN.

### *6.7. Tinción hematoxilina & eosina*

En este ensayo se sembraron las células en cajas Petri de 10 cm<sup>2</sup> con cubreobjetos para su exposición a NPs de TiO<sub>2</sub>. Al terminar el tiempo de exposición los cultivos se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 3% durante dos horas.

Una vez fijadas las células, se agregó hematoxilina a los cultivos durante 10 min y se lavaron con agua corriente. Para virar el color se bañaron los cultivos con alcohol ácido (70%) durante 2 segundos e inmediatamente se lavaron de nuevo con agua corriente.

Posteriormente se agregó eosina a los cultivos durante 2 minutos, se lavaron y se deshidrataron con alcohol absoluto.

Una vez que las células fueron teñidas, se montaron en portaobjetos para su posterior observación un microscopio óptico.

### *6.8. Obtención del índice mitótico*

Ya que en el análisis de ciclo celular por citometría de flujo no es posible diferenciar entre las fases G2 y M, se obtuvo el índice mitótico de los cultivos de cada uno de los grupos.

Para esto se contaron un total de 250 células en 10 campos separados, diferenciando las células mitóticas y no mitóticas con ayuda de un microscopio de campo claro. Con este fin, las células fueron teñidas con hematoxilina y eosina para distinguir las células en mitosis.

### *6.9. Análisis estadístico*

Para comprobar si existen diferencias significativas entre los tratamientos, los análisis utilizados en todos los ensayos fueron Anova de una vía para determinar si existen diferencias entre los grupos e índice de Dunnett para determinar cuáles son los tratamientos que tienen diferencias con respecto al control. Ambos análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.

## 7. Resultados

### 7.1. Internalización de las NPs de TiO<sub>2</sub>

El contraste de los neumocitos dado por la tinción con eosina y hematoxilina, permite apreciar la acumulación de NPs de TiO<sub>2</sub> dentro de las células. El cuadro A de la Figura 12 muestra la imagen de un neumocito de la línea A549 libre de NPs de TiO<sub>2</sub>, el cuadro B muestra un neumocito después de ser expuesto a 1 µg/cm<sup>2</sup> de NPs de TiO<sub>2</sub> durante 7 días, donde se observan los aglomerados de NPs de TiO<sub>2</sub> en el interior de la célula. En los cuadros C y D se observan células tratadas con 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs de TiO<sub>2</sub>, y se puede observar que hay mayor cantidad de NPs de TiO<sub>2</sub>, se localizan principalmente en la periferia del núcleo. Aparentemente la internalización de NPs de TiO<sub>2</sub> es proporcional a la concentración a la que se expusieron los cultivos (Figura 12).

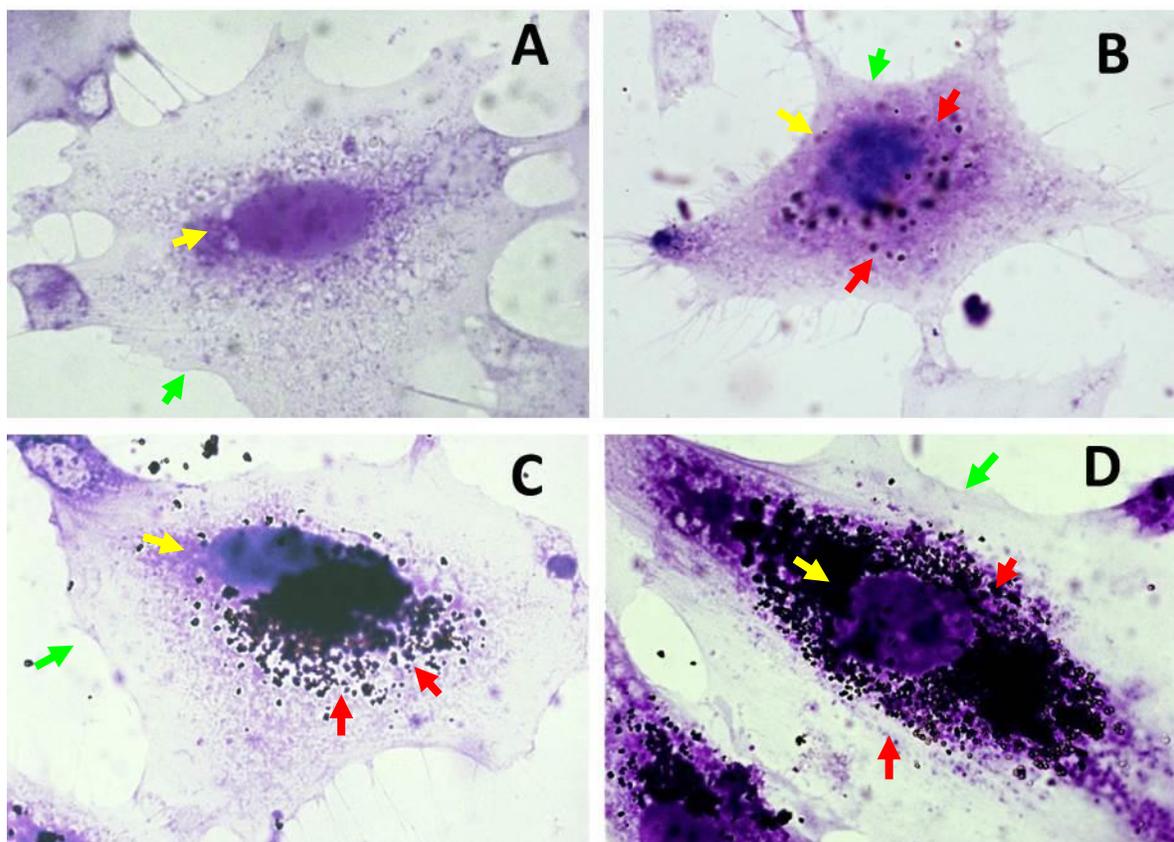


Figura 12. Imagen de neumocitos humanos expuestos 7 días a 0, 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs de TiO<sub>2</sub>. (A, B, C y D respectivamente). Las flechas amarillas señalan el núcleo, las flechas verdes indican el borde de la célula y las flechas rojas señalan los aglomerados de NPs de TiO<sub>2</sub>. Vista al microscopio con el objetivo 100X.

## 7.2. Análisis de la distribución del ciclo celular

En el presente trabajo la distribución del ciclo celular del cultivo de células A549 sin tratar fue de 71.27% de células en fase G1, 12.28% de células en fase S y 16.45% de células en fase G2/M. No se observaron diferencias significativas en la distribución del ciclo celular de los cultivos tratados con 1 y 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  siendo sus porcentajes respectivos de 72.65% y 68% para la fase G1, 13.67% y 15.3% para la fase S y 13.68% y 16.7% para para la fase G2/M. En el caso de los cultivos tratados con 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  la distribución fue de 66.7% en fase G1, 18.1% en fase S y 15.2% en fase G2, mostrando diferencias significativas solamente en la fase S (Figura 13).

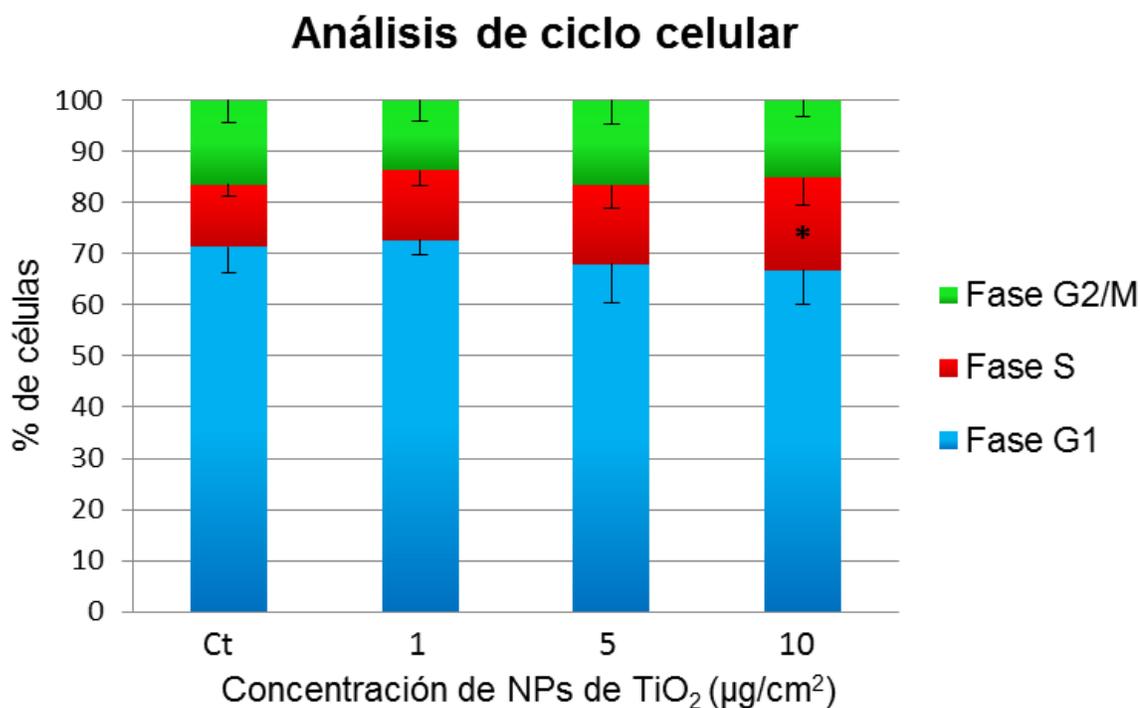


Figura 13. Análisis del ciclo celular de neumocitos expuestos 7 días a 0, 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$  correspondientes al grupo A, cultivos no arrestados. Se observa el porcentaje de células en las fases G1, S y G2. \* indica  $p < 0.05$  vs control,  $n = 7-9$ .

### 7.3. Evaluación del arresto con hidroxiurea

Las Figuras 14, 15 y 16 muestran el efecto de la exposición a 0.8 mM de hidroxiurea para el arresto de los cultivos tratados con NPs de TiO<sub>2</sub>, para lo cual se compararon los cultivos no arrestados pertenecientes al grupo A y los cultivos expuestos a 0.8 mM de hidroxiurea pertenecientes al grupo B. El porcentaje de células en fase G1 (Figura 14) fue de 71.27% y 77.63% en los controles de los cultivos de los grupos A y B respectivamente.

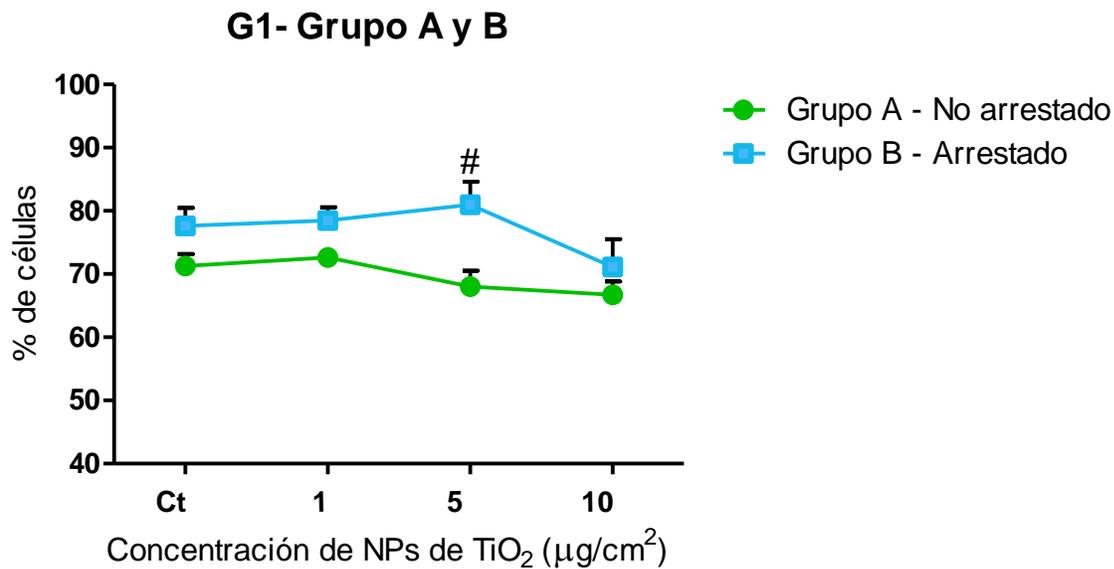


Figura 14. Efecto de la exposición a NPs de TiO<sub>2</sub> en el porcentaje de células en fase G1 después del arresto en fase G1/S con hidroxiurea. La gráfica muestra el porcentaje de células en fase G1 de los cultivos control y los cultivos tratados con 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> tanto del grupo A de cultivos no arrestados, como del grupo B de cultivos arrestados y liberados por 0 h. # indica  $p < 0.05$  vs 5 µg/cm<sup>2</sup> del grupo A.  $n = 11$  para el grupo A y 4 para el grupo B.

En los cultivos tratados NPs de TiO<sub>2</sub> el porcentaje de células en fase G1 en los grupos A y B respectivamente fue de: 72.65% y 78.48% en los cultivos expuestos a 1 µg/cm<sup>2</sup>; 68% y 80.95% en los cultivos expuestos a 5 µg/cm<sup>2</sup> y 66.72% y 71.12% para los cultivos tratados con 10 µg/cm<sup>2</sup>. No se observaron diferencias entre los cultivos pertenecientes al mismo grupo ni entre los controles de los diferentes grupos, sin embargo se observó mayor diferencia entre el porcentaje de los cultivos del grupo A y B tratados con 5 µg/cm<sup>2</sup>.

El porcentaje de células en fase S (Figura 15) de los cultivos control del grupo no arrestado (grupo A) fue de 12.28%. Para esta fase solamente los cultivos del grupo A tratados con 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  mostraron incremento en el porcentaje de células, siendo este de 18%. En los cultivos tratados con 1 y 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  los porcentajes de células en fase S fueron de 13.67% y 15.3% respectivamente y no se encontraron diferencias significativas.

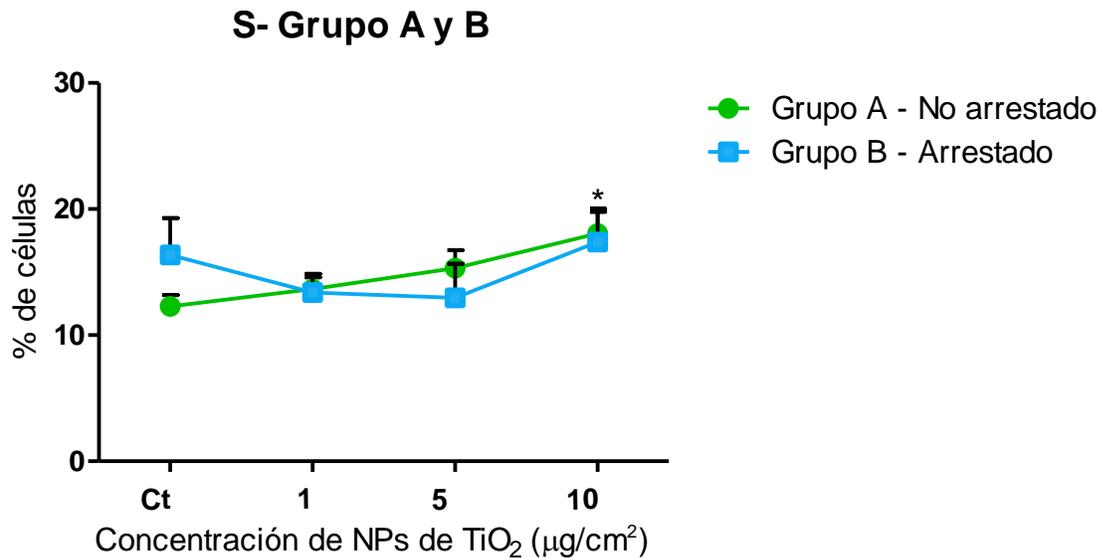


Figura 15. Efecto de la exposición a NPs de TiO<sub>2</sub> en el porcentaje de células en fase S después del arresto en fase G1/S con hidroxurea. La gráfica muestra el porcentaje de células en la fase S de los cultivos control y los cultivos tratados con 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  tanto del grupo A de cultivos no arrestados, como del grupo B de cultivos arrestados y liberados por 0 h. \* indica  $p < 0.05$  vs control del grupo A.  $n = 11$  para el grupo A y 4 para el grupo B.

En el grupo de cultivos arrestados por la exposición a 0.8 mM de hidroxurea (grupo B) se obtuvo un porcentaje de células del 16.35% para el control; 13.38% en el grupo tratado con 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; 12.97% en los cultivos tratados con 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; y 17.4% en los cultivos expuestos a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . No se observaron diferencias en los tratamientos de este grupo y tampoco hubo diferencia entre los cultivos tratados con la misma concentración de NPs de  $\text{TiO}_2$  de los diferentes grupos.

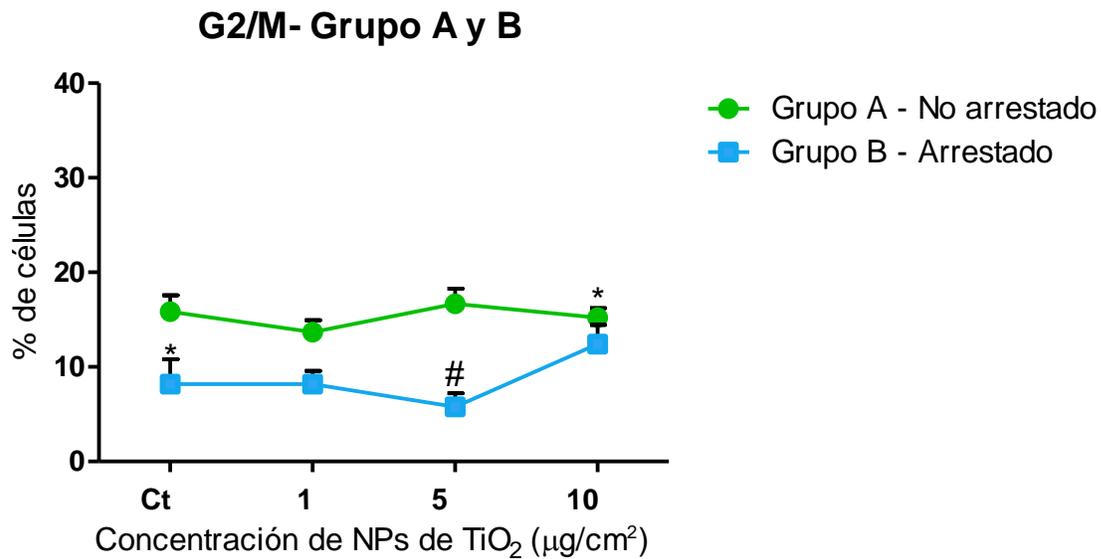


Figura 16. Efecto de la exposición a NPs de  $\text{TiO}_2$  en el porcentaje de células en G2/M después del arresto en fase G1/S con hidroxurea. La gráfica muestra el porcentaje de células en la fase G2/M de los cultivos control y los cultivos tratados con 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  tanto del grupo A de cultivos no arrestados, como del grupo B de cultivos arrestados y liberados por 0 h. \* indica  $p < 0.05$  vs control del grupo B. # indica  $p < 0.05$  vs 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  del grupo A.  $n = 11$  para el grupo A y 4 para el grupo B.

En cuanto a los porcentajes de células en fase G2 (Figura 16) se observa que no existen diferencias significativas en los tratamientos del grupo A, los datos obtenidos fueron 16.45% para el control y 13.67%, 16.69% y 15.21% para los tratamientos de 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  respectivamente.

En el grupo de los cultivos arrestados (grupo B) se observa el incremento del porcentaje de células en fase G2 de los cultivos tratados con 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  con 12.4% en comparación al 5.7% que se presentó en el control. En los tratamientos de 1 y 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  se encontraron porcentajes de 8.2% y 5.8% respectivamente, los cuales no mostraron diferencias significativas.

Es en esta fase donde se puede observar el efecto de la exposición a 0.8 mM de hidroximetilurea del grupo B ya que disminuye radicalmente el porcentaje de células en fase G2 del grupo control. De tal manera que el control del grupo A (no arrestado) muestra un 16.44% de células en fase G2, mientras que el grupo B tiene 5.6% de células en la misma fase.

En los cultivos tratados con 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  se observa el mismo efecto, ya que en los cultivos del grupo A se encontraron 16.7% de células en fase G2, mientras que en el grupo B se encontraron solo 5.8% de células en dicha fase. Al comparar cultivos tratados con 1 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de los grupos A y B no se encontraron diferencias significativas.

#### 7.4. Evaluación de la progresión del ciclo celular

Para medir la progresión del ciclo celular se comparó el porcentaje de células de cada tratamiento de los cultivos arrestados en fase G1/S con 0.8mM de hidroxurea y liberados por 0 h del arresto (grupo B) y cultivos arrestados en fase G1/S con 0.8 mM de hidroxurea pero liberados por 9 h del arresto (grupo C). De tal manera que los cultivos control del grupo B mostraron 77.6% de células en fase G1, mientras que el grupo C mostró 68.7%, el análisis estadístico no encontró diferencias significativas (Figura 17).

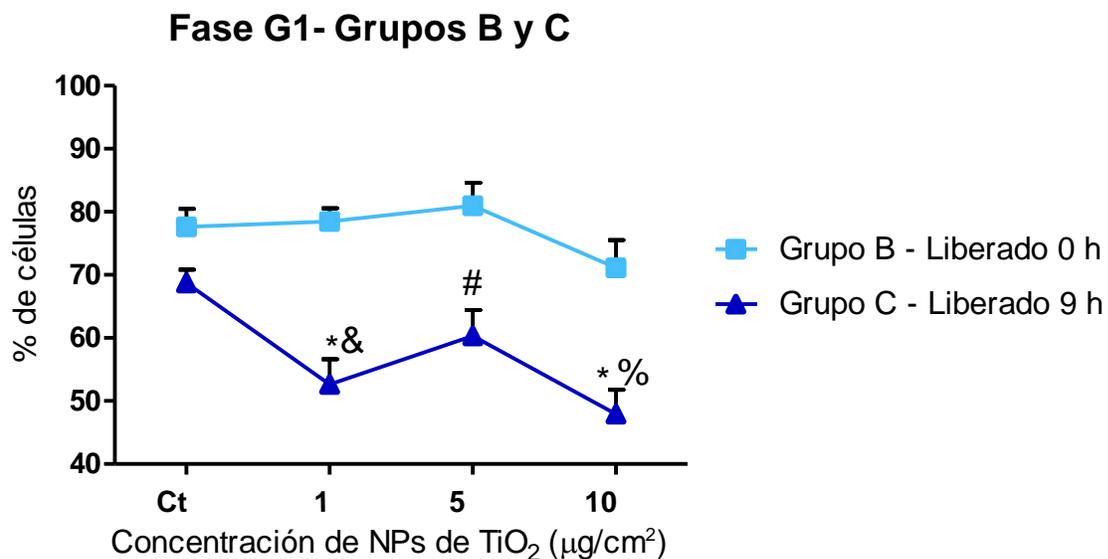


Figura 17. Progresión de la fase G1 del ciclo celular después de 9 h de la liberación del arresto en fase G1/S. Se observa el porcentaje de células en fase G1 de los cultivos control y cultivos tratados con 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> pertenecientes al grupo B de cultivos arrestados en fase G1/S y liberados por 0 y del grupo C de cultivos arrestados en fase G1/S y liberados por 9 h. \* indica  $p < 0.05$  vs control grupo C. & indica  $p < 0.05$  vs 1 µg/cm<sup>2</sup> del grupo B # indica  $p < 0.05$  vs 5 µg/cm<sup>2</sup> del grupo B. % indica  $p < 0.05$  vs 10 µg/cm<sup>2</sup> del grupo B. n = 4 - 5 en cada grupo.

Todos los cultivos expuestos a NPs de TiO<sub>2</sub> mostraron disminución significativa en el porcentaje de células en fase G1 del grupo C comparados con el porcentaje de células de los cultivos del grupo B expuestos a la misma concentración de TiO<sub>2</sub>. Es decir, se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de células en fase G1 de los cultivos tratados con 1 µg/cm<sup>2</sup> del grupo B y C siendo de 78.48% y 52.65% respectivamente, así como de los porcentajes de células en fase G1 de los cultivos tratados con 5 µg/cm<sup>2</sup> que corresponden a 80.95% para el grupo B y 60.32% para el grupo C y de los cultivos expuestos a 10 µg/cm<sup>2</sup> correspondientes a 71.13% y 47.92% de células para los grupos B y C respectivamente.

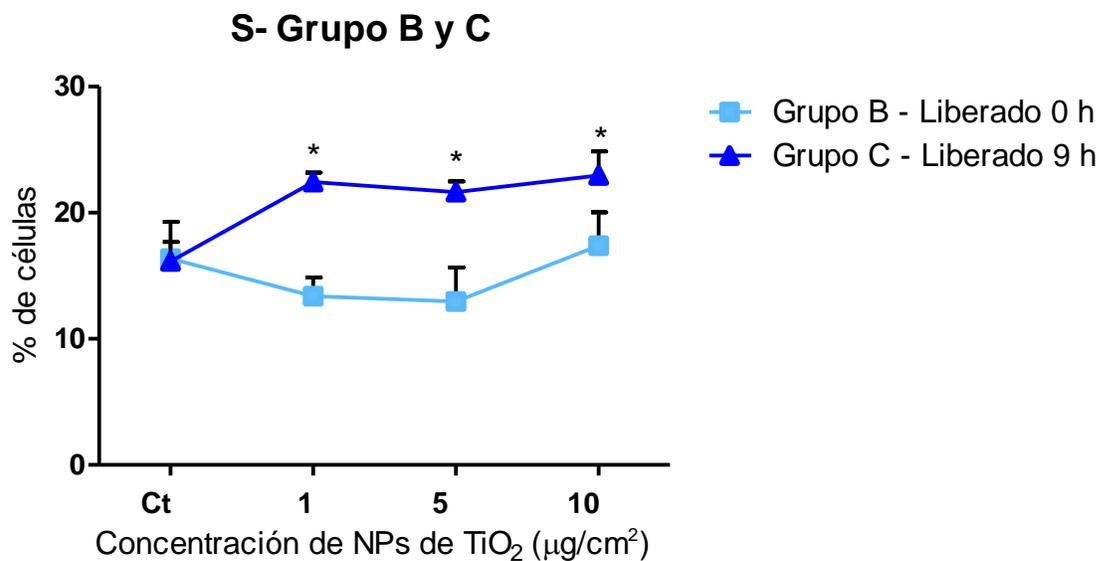


Figura 18. Progresión de la fase S del ciclo celular después de 9 h de la liberación del arresto en fase G1/S. Se observa el porcentaje de células en fase S de los cultivos control y cultivos tratados con 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> pertenecientes al grupo B de cultivos arrestados en fase G1/S y liberados por 0 y del grupo C de cultivos arrestados en fase G1/S y liberados por 9 h. \* indica p < 0.05 vs control grupo B. n = 4 - 5 en cada grupo.

Por otra parte, al realizar el análisis estadístico entre los tratamientos se observó que solamente los cultivos tratados con 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs de TiO<sub>2</sub> pertenecientes al grupo C mostraron diferencias significativas.

En cuanto a la progresión de células en fase S (Figura 18) se observó el incremento del porcentaje de células en fase S en todos los cultivos tratados con NPs de TiO<sub>2</sub> del grupo C, en cuanto a los cultivos del grupo B, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos.

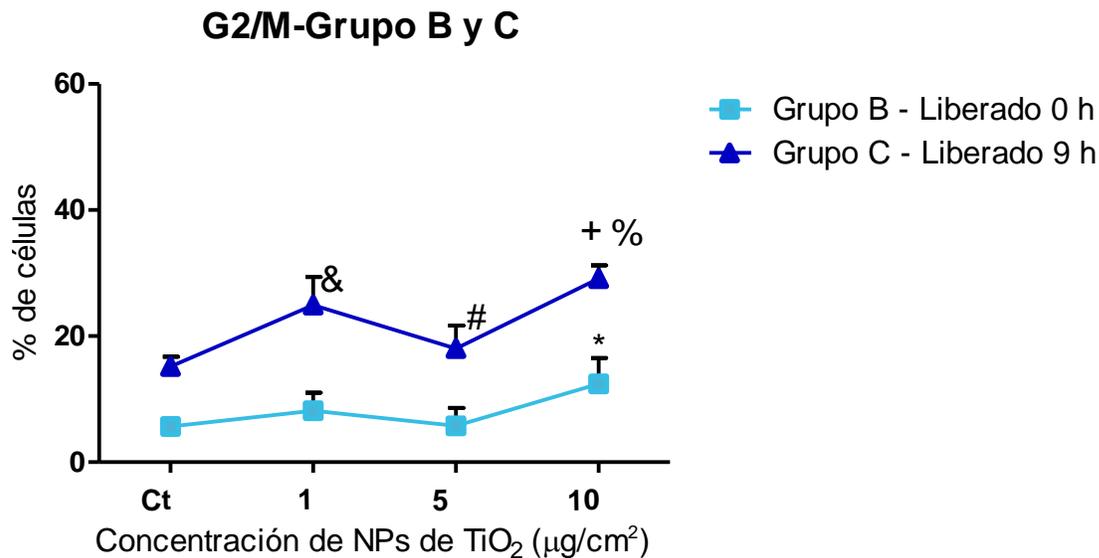


Figura 19. Progresión de la fase G2/M del ciclo celular después de 9 h de la liberación del arresto en fase G1/S. Se observa el porcentaje de células en fase G2/M de los cultivos control y cultivos tratados con 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> pertenecientes al grupo B de cultivos arrestados en fase G1/S y liberados por 0 y del grupo C de cultivos arrestados en fase G1/S y liberados por 9 h. \* indica p < 0.05 vs control del grupo B, + indica p < 0.05 vs control del grupo C, & indica p < 0.05 vs 1 µg/cm<sup>2</sup> del grupo B, # indica p < 0.05 vs 5 µg/cm<sup>2</sup> del grupo B, % indica p < 0.05 10 µg/cm<sup>2</sup> del grupo B. n = 4 - 5 en cada grupo.

Al realizar la comparación del porcentaje de células de los tratamientos entre los grupos B y C no se encontraron diferencias significativas.

En los porcentajes de células en fase G2/M del grupo B, solamente se observaron diferencias significativas en los cultivos tratados con 10 µg/cm<sup>2</sup> teniendo 12.41%. De igual manera solo los cultivos tratados con 10 µg/cm<sup>2</sup> mostraron diferencias significativas en el grupo C, con 29.118%. Al comparar los grupos se observó que hay diferencias entre todos los tratamientos, no siendo así para los controles (Figura 19).

### 7.5. Porcentaje de células mitóticas

En cuanto al porcentaje de mitosis (Figura 20), se observó que no existen diferencias en los tratamientos del grupo B. Los porcentajes correspondientes para los cultivos de este grupo son 0.016% para el control, 0.02% para 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 0.016% para 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 0.04% para 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . En los cultivos del grupo C solamente se observó incremento en las células tratadas con 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$  grupo C, en este grupo los porcentajes obtenidos fueron 3.15% para el control, 3.9% para los cultivos tratados con 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 7.97% para las células tratadas con 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 4.9% para los cultivos tratados con 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

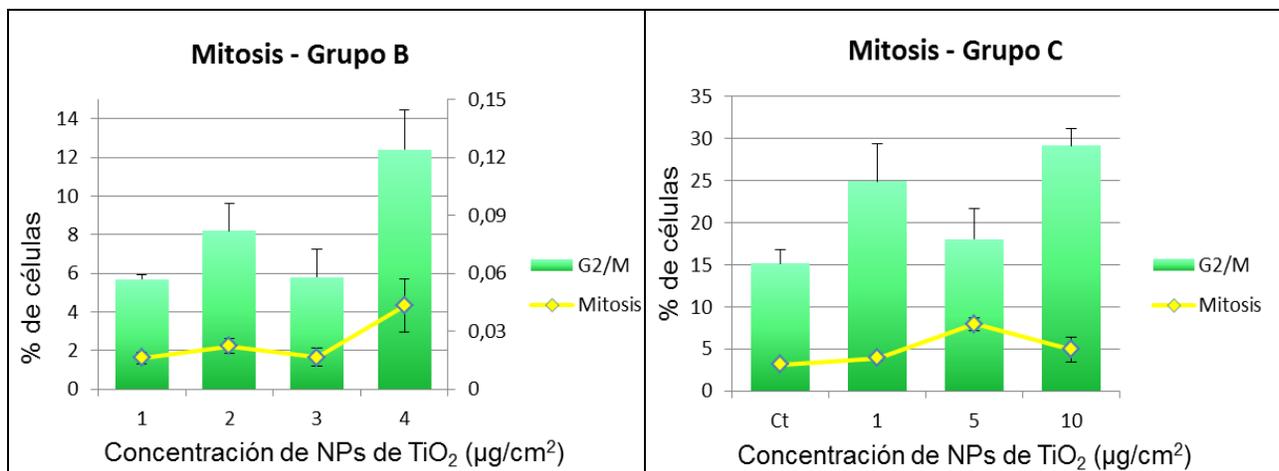


Figura 20. Porcentaje de células en mitosis de cultivos arrestados con hidroxiurea en fase G1/S (Grupo B) y cultivos liberados 9 h después del arresto en fase G1/S (Grupo C). \* Índica  $p < 0.05$  vs control grupo C.

### 7.6. Efecto en la cantidad de ADN

Finalmente la cuantificación de ADN muestra (Figura 21) que no existen diferencias en la concentración de ADN de los neumocitos tratados con NPs de  $\text{TiO}_2$ , demostrando que las alteraciones encontradas en el ciclo celular de los neumocitos tratados no son provocadas por variaciones en la cantidad de ADN.

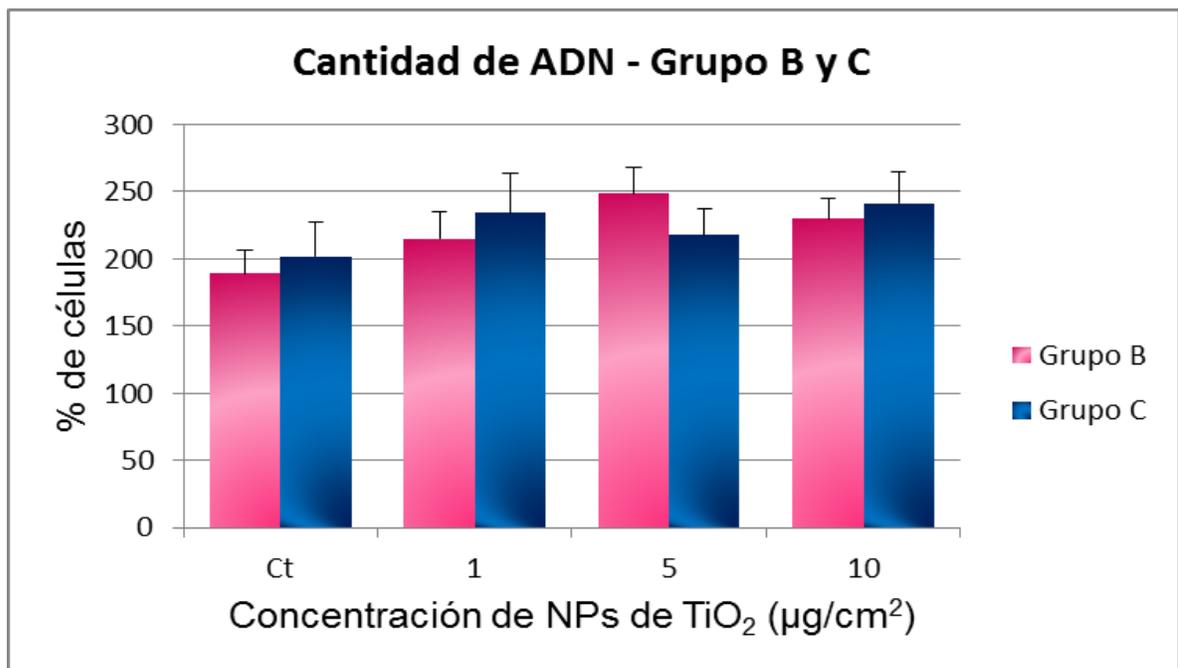


Figura 21. Cuantificación de ADN total de 400 000 neumocitos expuestos 7 días a 0, 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$ . Se muestra la concentración de ADN de cultivos arrestados con hidroxurea en fase G1/S (Grupo B) y cultivos liberados 9 h después del arresto en fase G1/S (Grupo C).

## 8. Discusión

En el presente trabajo se observó que la acumulación de NPs de  $\text{TiO}_2$  dentro de las células es aparentemente proporcional a la concentración a la que fueron expuestos los cultivos. Una explicación a esto es que el proceso de captación de NPs de  $\text{TiO}_2$  se dio de manera continua durante el tiempo de exposición, lo cual es semejante a la endocitosis normal de las células A549, la cual ocurre de manera constante (Foster *et al.*, 1998). Sustentando esta explicación Stearns (2001) reporta que al exponer células de la línea A549 a NPs de  $\text{TiO}_2$  durante 24 h, estas fueron endocitadas incesantemente.

Por otra parte, aunque no existen suficientes estudios sobre la exocitosis de NPs de  $\text{TiO}_2$  en células A549, se ha observado que en células neuronales de ratón de la línea C17.2 la tasa de exocitosis de las NPs de  $\text{TiO}_2$  decrece con el tiempo (Wang *et al.*, 2013b). Ya que la exocitosis es un proceso común en esta línea celular, es probable que tenga un comportamiento similar a lo reportado en células neuronales.

Otro punto importante es que las células A549 distribuyen las NPs internalizadas durante la división celular, de manera que ambas células hijas conservan la mitad de NPs (Kim *et al.*, 2011). Aunado a esto, Wang *et al.* (2013b) reportaron que no hay internalización de NPs de  $\text{TiO}_2$  durante la división celular.

En cuanto a la localización intracelular de las NPs de  $\text{TiO}_2$ , éstas se observaron principalmente en el citoplasma. Una explicación a esto es que, para el caso de los neumocitos tipo II de la línea A549, las NPs de  $\text{TiO}_2$  internalizadas se encuentran principalmente en el citoplasma, unidas a la membrana de las vacuolas o a los cuerpos lamelares (Stearns, 2001). Esto es consistente con que el hecho de que la función principal de la endocitosis de los neumocitos tipo II es el reciclaje de las estructuras del tensoactivo pulmonar, el cual es almacenado en las vacuolas membranales y transportado a los cuerpos lamelares para su reciclaje (Wissel *et al.*, 2001).

Se ha demostrado en otro tipo de células, como es el caso de las células epidermales de la línea A431, que las NPs de  $\text{TiO}_2$  internalizadas se distribuyen tanto en el núcleo como en el citoplasma (Shukla *et al.*, 2010), sin embargo en el presente trabajo se observó que la mayoría de las NPs rodearon al núcleo sin lograr internalizarse en él. Esta localización intracelular también ha sido observada por Bhattacharya *et al.* (2008) quienes reportaron que en células del epitelio bronquial

(BEAS-2B) expuestas 48 h a NPs de  $\text{TiO}_2$ , tanto los aglomerados como las partículas libres son encontradas en estructuras vacuolares principalmente cerca del núcleo.

De igual forma se ha observado esta distribución en células A549 expuestas a otro tipo de nanopartículas; en el 2013 Wang y Petersen (2013), expusieron neumocitos tipo II de la línea A549 a nanopartículas de oro cubiertas con sal sódica y observaron que éstas no ingresan al núcleo y que están localizadas en compartimentos que aparentemente son los cuerpos lamelares.

Esto permite plantear que la distribución de las NPs de  $\text{TiO}_2$  se debe al tipo celular, ya que aparentemente los neumocitos de la línea A549 solamente internalizan aglomerados de NPs de  $\text{TiO}_2$  (Stearns, 2001), las cuales, al ser más grandes que las partículas libres no pueden ingresar directamente al núcleo.

Además se sabe que las NPs tienen una alta afinidad a las macromoléculas, particularmente a las proteínas y ya que el comportamiento de los agregados es diferente a las partículas libres, la interacción con las proteínas tampoco se da de la misma forma. Esta diferencia en la interacción de las proteínas puede afectar la manera en la que las células son internalizadas y distribuidas dentro de la célula (Fröhlich, 2012).

En cuanto al efecto de las NPs de  $\text{TiO}_2$  en la distribución de las fases del ciclo celular, solamente la fase S fue afectada por las NPs de  $\text{TiO}_2$ . Esto puede deberse a la reducción en la tasa de síntesis de ADN ocasionada por los puntos de restricción de fase S, probablemente en respuesta a la inducción de rompimientos de doble cadena ocasionados por las NPs de  $\text{TiO}_2$  (Msiska *et al.*, 2010). Cuando ocurre un daño durante la fase S, la proteína ATM activa dos vías paralelas, una vía involucra a CHK2, CDC25A y CDK2, en este proceso es probable que el principal regulador es CDK2, el cual es inactivado a través de una ruta que es independiente de p53 y p21 para ocasionar un rápido pero trascendente decremento de la tasa de síntesis de ADN. La ruta paralela está relacionada con el complejo trimérico de proteínas MRE11-NBS1-RAD50 y el mecanismo de reparación promueve la recombinación homóloga (Woo y Poon, 2003).

Este resultado también puede estar relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno que las NPs de  $\text{TiO}_2$  causan dentro de las células (Shukla, 2011), ya que de acuerdo a Burhans y Heintz (2009), se ha observado que los oxidantes pueden provocar el arresto del ciclo celular en fase S a través de mecanismos independientes a la respuesta clásica de daño al ADN

dependiente de ATM, pero involucrados con la defosforilación de pRB. Aunque no se conoce el mecanismo exacto se sabe que esta respuesta no es dependiente de p21 o p53 y no es consecuencia de la actividad reducida de las CDKs, sino más bien está relacionada con la inactivación de la proteínas fosfatasa 2A. Para poder corroborar esta hipótesis es necesario realizar estudios que comprueben que las NPs de TiO<sub>2</sub> afectan la actividad de la proteína fosfatasa 2 A.

Este resultado fue diferente en comparación con otros estudios, por ejemplo Kocbek, *et al.* (2010), encontraron que no existen diferencias en la distribución del ciclo celular de queratinocitos tratados con 0.5 µg/mL de NPs de TiO<sub>2</sub>. Como posible explicación se ha observado que hay diferencias en la aglomeración de las NPs de TiO<sub>2</sub> dependiendo del medio en el que suspenden y está reportado que estas diferencias intervienen en el efecto de las NPs de TiO<sub>2</sub> sobre el ciclo celular (Prasad *et al.*, 2013). Otra posible explicación es el cambio en las condiciones del ensayo, como pueden ser el modelo de estudio o el tiempo de exposición (3 meses en el trabajo de Kocbeck, *et al.*, 2010).

Los resultados del efecto en el arresto del ciclo celular mostraron en el control del grupo B, la disminución del porcentaje células en fase G2/M, lo cual indica el arresto del ciclo celular. Sin embargo en los cultivos tratados con NPs de TiO<sub>2</sub> no disminuyó el porcentaje de células en esta fase, indicando resistencia al arresto.

El mecanismo del arresto por hidroxurea es la inhibición de la enzima ribonucleótido reductasa, que cataliza la síntesis de desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos. El incremento en la actividad de la enzima resulta en una gran expansión de las reservas de dNTPs confiriendo resistencia a la inhibición de la replicación de ADN por hidroxurea, de tal manera que estos resultados pueden deberse a la sobreexpresión de la enzima provocada directamente por las NPs de TiO<sub>2</sub> o a la sobreproducción de dNTPs por la enzima, causada por daño en el ADN (Saban y Bujak, 2009; Davidson *et al.*, 2012).

Sustentando la segunda explicación, se sabe que esta enzima se sobre activa cuando existe daño al ADN a través de un mecanismo dependiente p53 y las NPs de TiO<sub>2</sub> son capaces de causar rompimientos de doble cadena del ADN en células A549 (Toyooka *et al.*, 2012). Las células eucariotas utilizan dos principales caminos para la reparación de este tipo de daño: la reparación homóloga y la reparación no homóloga. La reparación homóloga es preferentemente utilizada por las células, sin embargo este tipo de reparación es mucho más dependiente de desoxirribonucleótidos y por tanto requieren del incremento de la actividad de la ribonucleótido

reductasa (Burkhalter, 2009), de tal manera que el incremento de la actividad de esta enzima pudo provocar la resistencia al arresto en fase G1/S con hidroxiurea.

Se observó que en el porcentaje de células en fase S hay incremento de los cultivos del grupo C tratados con  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Figura 18), esto puede indicar el atraso en la progresión de las células dentro de esta fase. De acuerdo con Woo y Poon (2003) este efecto puede deberse a la reparación del ADN por medio de un punto de reparación de daño intra-S ya que se ha observado que las células responden al rompimiento de doble cadena durante la fase S, disminuyendo la tasa de síntesis de ADN.

Si esta idea es correcta, esto significaría que el daño en el ADN de las células expuestas previamente a hidroxiurea es mayor al de las células que no fueron expuestas. Esto es importante porque se ha observado que la delección parcial de desoxirribonucleótidos por inhibición de la enzima ribonucleótido reductasa con hidroxiurea incrementa el número activo de orígenes de replicación, de manera que la interrupción y posterior activación de la replicación del ADN, además de las perturbaciones en el metabolismo, pueden causar la detención de las horquillas de replicación y ocasionar estrés en la replicación, desencadenando así respuestas de daño al ADN en la fase S (Burhans y Heintz, 2009).

En los tratamientos de  $1$  y  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$  del grupo C también se observó incremento en el porcentaje de fase G2/M, indicando que puede activarse el punto de control de esta fase del ciclo celular por daño al ADN, el cual en conjunto a la resistencia al arresto observada en fase G1/S, pueden explicar el incremento de células en esta fase.

En cuanto al porcentaje de mitosis, se observó que no existen diferencias en los tratamientos del grupo B, sin embargo hay incremento en los cultivos tratados con  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs de  $\text{TiO}_2$  grupo C (Figura 20). Este comportamiento puede deberse a la sobreexpresión de las ciclinas que inducen salida a la mitosis. Se sabe que el proceso que da salida a la mitosis es la disociación del complejo CDK1/ciclina A, de manera que la sobreexpresión de esta proteína puede ocasionar el incremento de células mitóticas. Esto concuerda con lo reportado por Chen *et al.* 2006, quienes observaron el incremento en la expresión de las ciclinas B1, D1 y E1 y CDK1 en tejido pulmonar tratado con NPs de  $\text{TiO}_2$ .

Finalmente la cuantificación de ADN muestra que no existen diferencias en la concentración de ADN de los neumocitos tratados con NPs de  $\text{TiO}_2$ , demostrando que las alteraciones encontradas

en el ciclo celular no son provocadas por variaciones en la cantidad de ADN de las células utilizadas en cada ensayo y entre tratamientos. Además de esto, se sabe que ciertos agentes pueden provocar variación en el número de copias genómicas (Falola *et al.*, 2013), de manera que también se demuestra que las concentraciones utilizadas de NPs de TiO<sub>2</sub> no producen alteraciones significativas de este tipo en las células A549.

## 9. Conclusiones

1. Las NPs de TiO<sub>2</sub> son internalizadas por los neumocitos tipo II e intracelularmente se localizan principalmente en la periferia del núcleo.
2. Los neumocitos expuestos a 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs de TiO<sub>2</sub> incrementan el porcentaje de células en fase S.
3. Los neumocitos expuestos a 1 y 10 µg/cm<sup>2</sup> exhiben resistencia al arresto en fase G1/S del ciclo celular.
4. Los neumocitos tratados con NPs de TiO<sub>2</sub> muestran aceleración en la progresión del ciclo celular después de su arresto.
5. La exposición a 5 µg/cm<sup>2</sup> a NPs de TiO<sub>2</sub> inducen el incremento en el porcentaje de células mitóticas.
6. Las alteraciones provocadas por las NPs de TiO<sub>2</sub>, en el ciclo celular de neumocitos humanos, no se deben a variaciones en la cantidad de ADN de las células.

## 10.Recomendaciones

Es importante establecer una legislación que integre a las NPs de  $\text{TiO}_2$  tomando en cuenta los riesgos que esta representa. Esta legislación debe estar enfocada en regular tanto a los productos que contienen NPs de  $\text{TiO}_2$  como en controlar los límites de exposición dermal e inhalatoria en áreas ocupacionales.

Otro punto importante es dar a conocer a la población información precisa y científica acerca de los productos que contienen NPs de  $\text{TiO}_2$ , así como los riesgos que éstas representan para la salud.

Dado que en México las NPs de  $\text{TiO}_2$  son utilizadas en una gran cantidad de productos tanto alimenticios como de contacto dermal, es importante que la población que los consume esté informada acerca qué productos contienen  $\text{TiO}_2$  y en qué cantidad.

Finalmente, es indispensable promover un nuevo reglamento que ayude a evitar la interacción entre las NPs de  $\text{TiO}_2$  y el ambiente con el fin de proteger al ambiente y evitar rutas de exposición no deseadas.

## 11. Perspectivas

Los resultados que se presentan en este trabajo sugieren la alteración de las proteínas que regulan la progresión del ciclo celular provocada por las NPs de TiO<sub>2</sub> de manera que es importante realizar los siguientes ensayos en células expuestas a NPs de TiO<sub>2</sub>:

- 1.- Determinación de la síntesis de ADN.
- 2.- Evaluación del arresto celular con mayores concentraciones de hidroxiquina.
- 3.- Determinación de la expresión de los genes que expresan las proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular, tales como CDK1, 2, 4 y 6 y ciclinas A, B, D y E.
- 4.- Determinación de la expresión de las proteínas mencionadas en el punto anterior.
- 5.- Evaluación de la expresión y actividad de la enzima ribonucleótido reductasa, para explicar la resistencia al arresto.
- 6.- Comprobación de daño en el material genético utilizando H2AX como marcador de daño, el cual determina la presencia de rompimientos de doble cadena en el ADN y relación con las alteraciones provocadas en el ciclo celular.

## 12. Referencias

- Arellano, M. y Moreno, S. 1997. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol.* 29 (4): 559-573.
- Allouni, Z., Høl, P., Cauqui, M., Gjerdet, N. y Cimpan, M. 2012. Role of physicochemical characteristics in the uptake of TiO<sub>2</sub> nanoparticles by fibroblasts. *Toxicology in vitro.* 26: 469-479.
- Baan R., 2007. Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. *Inhal Toxicol*, 19(1):213–228.4
- Bates, S. 2010. P63 (CKAP4) as an SP-A Receptor: Implications for surfactant turnover. *Cell physiol biochem.* 41-54.
- Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R., Hoffmann, E. y Dopp, E. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology.* 6-17.
- Boffeta, P., Soutar, A. y Cherrie, J. 2004. Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe. *Cancer Causes Control.* 15: 697-706.
- Burhans, W. y Heintz, N. 2009. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radical Biology & Medicine.* 47: 1282-1293.
- Burkhalter, M., Roberts, S., Havener, J. y Ramsden, D. 2009. Activity of ribonucleotide reductase helps determine how cells repair DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst).* 8 (11): 1258-1263.
- Chen, H., Su, S., Chien, C., Lin, W., Yu, S., Chou, C., Chen, J. y Yang, P. 2006. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *The FASEB Journal.* 20: E1732- E1741.
- Collins, I. y Garrett. M. 2005. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology.* 5:366-373.
- Cui, Y., Gong, X., Duan, Y., Li, N., Hu, R., Liu, H., Hong, M., Zhou, M., Wang, L, Wang, H y Hong, F. 2010. Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* 183: 874-880.

Davidson, M., Katou, Y., Keszthelyi, A., Sing, T., Xia, T., Ou, J., Vaisca, J., Thevakumaran, N., Marjavaara, L., Myers, C., Chabes, A., Shirahige, K. y Brown, G. 2012. Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *The EMBO Journal*. 31: 895-907.

Duursma, A. y Agami, R. 2005. CDK-Dependent stabilization of Cdc6. *Cell cycle* 4:12. 1725-1728.

Falola, M., Wiener, H., Wineinger, N., Cutter, G., Kimberly, R., Edberg, J., Arnett, D., Kaslow, R., Tang, J. y Sherstha, S. 2013. Genomic copy number variants: evidence for association with antibody response on anthrax vaccine adsorbed. *Plos one* 8(5): e64813

Fisichella, M., Berenguer, F., Steinmetz, G., Auffan, M., Rose, J. and Odette Prat. 2012. Intestinal toxicity evaluation of TiO<sub>2</sub> degraded surface-treated nanoparticles: a combined physic-chemical and toxicogenomics approach in caco-2 cells. *Part Fibre Toxicol*. 9:18.

Fröhlich, E. 2012. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J of Nanomed*. 7: 5577-5591.

Guichard, S., Schmit, J., Darne, C., Gaté, L., Goutet, M., Rousset, D., Rastoix, O., Wrobel, R., Witschger, O, Martin, A., Fierro, V. y Binet, S. 2012. Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and microsized titanium dioxide and iron oxide particles in Syrian hamster embryo cells. *Ann occup hyg*. 56 (5): 631-644

Guozhong, C. 2004. Nanostructures and nanomaterials, síntesis, properties and applications. Imperial college press.

Gurr, J., Wang, A., Chen, C. y Jan, K. 2005. Toxicology. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. 213: 66-73.

Hallock, M., Greenley, P., DiBerardinis, L. y Kallin, D. 2008. Potential risks of nanomaterials and how to safely handle materials of uncertain toxicity. *JCHAS*. 16:16-23.

Hext, P., Tomenson, J. y Thompson, P. 2005. Titanium dioxide: inhalation Toxicology and epidemiology. *Ann. Occup. Hyg*. 49 (6): 461-472.

Higareda-Mendoza y Pardo-Galvan. 2010. Expression of human eukaryotic initiation factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability. *Cell division*. 5 (10): 1-13.

Huang, S., Chueh, P., Lin, Y., Shih, T. y Chuang, S. 2009. Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO<sub>2</sub> long-term exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241: 182-194.

Hussain, S., Thomassen, L., Ferecatu, I., Borot, M., Andreau, K., Martens, J., Fleury, J., Baeza-Squiban, A., Marano, F. y Boland, S. 2010. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology.* 7-10.

Jaeger, A., Weiss, D., Jonas, L. y Kriehuber, R. 2012. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology.* 296: 27-36.

Johnson, D. y Walker, C. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:295-312.

Kang, S., Kim, B., Lee, Y. y Chung, H. 2008. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environ mol mutagen.* 49:399-405.

Knaapen, A., Borm, P., Albrecht, C. y Schins, P. 2004. Inhaled particles and lung cancer. Part A: mechanisms. *Int. J. Cancer.* 109: 799-809.

Kocbek, P. Teskac, K., Kreft y M. Kristl, J. 2010. Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Small.* 6:1908-1917

Koivisto, A., Lyyränen, J., Auvinen, A., Vanhala, E., Hämeri, K., Tumoi, T. y Jokiniemi. J. 2012. Industrial worker exposure to airborne particles during the packing of pigment and nanoscale titanium dioxide. *Inhal Toxicol.* 24(12):839-849.

Lee, Y., Yoon, S., Yoon, H., Lee, K., Yoon, H., Lee, J. y Song, C. 2009. Inhibitor of differentiation 1 (Id1) expression attenuates the degree of TiO<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in H1299 non-small cell lung cancer cells.

Li, N., Duan, Y., Hong, M., Zheng, L., Fei, M., Zhao, X., Wang, J., Cui, Y., Liu, H., Cai, J., Gong, S., Wang, H., Hong, F. 2010. Spleen injury apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters.* 195: 161-168.

Lori, F. y Lisziewicz, J. 2000. Rational for the use of hydroxyurea as an anti-human immunodeficiency virus drug. *Clin Infec Dis.* 30:S193-S1997.

Lövestam, G., Rauscher, H., Roebben, G., Klüttgen, B., Gibson, N., Putaud, J. y Stamm, H. 2010. Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes. JRC reference reports. 40 p.

Malumbre, M. y Barbacia, M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews, cancer* (9): 153-167.

Msiska, Z., Pacurari, M., Mishra, A., Leonard, SS., Castranova, V. y Vallyathan, V. 2010. DNA double-strand breaks by asbestos, sílica, and titanium dioxide: posible biomarker of carcinogenic potential? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 43 (2): 210- 219.

Nayab, S., Jones, F., Olsen, I. 2006. Modulation of the human bone cell cycle by calcium ion-implantation of titanium. *Biomaterials.* 28: 38-44.

Neganova, I. y Lako, M. 2008. G1 a S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. *J Anat* 1: 30-44.

NIOSH. 2011. Occupational exposure to titanium dioxide. In: Current intelligence bulletin 63. Cincinnati: National Institute for Occupational Safety and Health.

Nohynek, G. y Schaefer, H. 2001. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. *Regul Toxicol Pharmacol.* 333:285-299.

Ramkumar, K., Chinnasamy, M., GnanaKumar, G., Kanjwal, M., Sekar, T., Paulmurugan, R. y Rajaguru, P. 2012. Oxidative stress-mediated cytotoxicity and apoptosis induction by TiO<sub>2</sub> nanofibers in HeLa cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81: 324-333.

Robertson, T., Sanchez, W., Roberts, M. 2010. Are commercially available nanoparticles safe when applied to the skin? *J Biomed Nanotechnol.* 6:452-468.

Saban, N. y Bujak, M. 2009. Hydroxyurea and hydroxamic acid derivatives as antitumor drugs. *Cancer Chemother Pharmacol.* 64 (2): 213-21.

Saqib, Q., Al-Khedhairi, A., Siddiqui, M., Abou –Tarboush, A. y Musarrat, J. 2012. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicology in vitro* 26: 351-361.

Saxena, S. 2005. Lung surfactant, the indispensable component of respiratory mechanics. *Research news.* 91-96.

- Schmitz y Müller, 1991. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J lipid res.* 32: 1539-1570.
- Shemetov, A., Nabiev, I. y Sukhanova, A. 2012. Molecular interaction of proteins and peptides with nanoparticles. *ACS Nano* 6 (6): 4585-4602
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V. y Zhao, J. 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and fibre toxicology.* 10 (15):1-33
- Shukla, R., Sharma, V., Pandey, A., Shingh, S., Sultana, S. y Dhawan, A. 2011. ROS mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol in Vitro.* 25:231-241.
- Skocaj, M., Filipic, M., Petkovic, J. y Novak, S. 2011. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiol Oncol.* 45(4): 227-247.
- Tedja, R., Lim, M., Amal, R. y Marquis, C. 2012. Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. *Acsnano.* 6 (5): 4083-4093.
- Toyooka, T., Amano, T. y Ibuki, Y. 2012. Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutation research.* 742: 84-91.
- Wang, J., Fan, Y., Gao, Y., Hu, O., Wang, T. 2009. TiO<sub>2</sub> nanoparticles translocation and potential toxicological effect in rats after intraarticular injection. *Biomaterials.* 30: 4590-4600
- Wang, J., Gerlach, J., Savage, N. y Cobb, G. 2013. Necessity and approach to integrated nanomaterial legislation and governance. *Sci. Total Environ.* 442: 56-62.
- Wang, J., Sanderson, B. y Wang, H. 2007. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutation Research.* 628: 99-106.
- Wang, S., Hunter, L., Arslan, Z., Wilkerson, M. y Wickliffe, J. 2011. Chronic Exposure to nanosized, anatase titanium dioxide is not cyto- or genotoxic to chinese hamster ovary cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 52: 614-622.
- Wang, Y., Wu, Q., Sui, K., Chen, X., Fang, J., Hu, X., Wu, M. y Liu, Y. 2013b. A quantitative study of exocytosis of titanium dioxide nanoparticles from neural stem cells. *Nanoscale.* 5: 4737-4743.

Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L. Hristovski, K. y Goetz, N. 2012. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol.* 46: 2242-2250.

Wissel, H., Lehfeldt, A., Klein, P., Müller, T. y Stevens, P. 2001. Endocytosed SP-A and surfactant lipids are sorted to different organelles in rat type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281: L345-L360.

Woo, R. y Poon, R. 2003. Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell cycle.* 2(4): 316-324).

Xie, Y., He, Y., Irwin, P., Jin, T. y Shi, X. 2011. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Appl environ microbiol.* 77 (7): 2324-2331.

Xu, Y., Liu, L., Qiu, X., Jiang, L., Huang, B., Zixuan, L., Luo, W. y Wang, E. 2011. CCL21/CCR7 Promotes G2/M phase progression via the ERK pathway in human non-small cell lung cancer cells. *Plas one.* 6:1-10.